

CARACTÉRISATION DES GÈNES CANDIDATS RÉGULÉS AU NIVEAU
TRADUCTIONNEL DURANT LA RÉPONSE DE DÉFENSE NB-LRR DES PLANTES

par

Teura Barff

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, février 2018

Le 16 février 2018

le jury a accepté le mémoire de Madame Teura Barff dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Peter Moffett
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Kamal Bouarab
Co-directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Viktor Steimle
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeure Nathalie Beaudoin
Présidente-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Parmi les différents mécanismes de défense des plantes, on compte notamment la *Effector-Triggered immunity* (ETI) qui repose sur l'activation de protéines de résistance, les NB-LRR (*Nucleotide-Binding Leucine-Rich-repeat*). Plusieurs études tentant de caractériser cette réponse immunitaire en ont conclu suite à des analyses transcriptomiques, qu'elle était qualitativement similaire à la première étape de défense. Cette première étape repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*Pattern-triggered immunity*). Très récemment, suite à l'analyse du traductome d'*A. thaliana* après induction de la ETI, de nombreux gènes avec une efficacité de traduction découplée de leur transcription ont été identifiés. Ainsi, de nouveaux acteurs de la réponse de défense enclenchée par l'activation d'une protéine NB-LRR ont été identifiés, certains d'entre eux étant inhibés au niveau de la traduction et d'autres induits au niveau post-transcriptionnel. Parmi ces candidats, certains sont connus pour être impliqués dans la résistance aux stress abiotiques et biotiques, tel que *Redox Responsive Transcription Factor 1* (*RRTF1*), *Phosphorylcholine Cytidyltransferase 2* (*CCT2*) ou encore *Pentatricopeptide repeat protein for Germination on NaCl* (*PGN*). D'autres ont fait l'objet de nombreuses études comme c'est le cas de *Target Of Rapamycin* (*TOR*), *BIG*, ou *CBL-interacting protein kinase 5* (*CIPK5*) mais n'ont jusqu'à maintenant jamais été mis en lien avec la résistance des végétaux. Enfin, un petit nombre d'entre eux, dont AT1G07280 renommé ici *TPR* (*Tetratricopeptide repeat-like*), n'ont encore jamais été caractérisés. Afin de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la réponse de défense des plantes, la susceptibilité de lignées transgéniques *knock out* pour les gènes candidats, suite à l'infection par différents agents pathogènes, a été testée. Trois pathosystèmes ont été utilisés, comprenant la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, et les agents pathogènes *Pto* DC3000 (avirulent ou virulent), *H. a.* et *PLAMV* dans chacun des systèmes. Ainsi, en accord avec les données du traductome de défense de la plante modèle, des régulateurs négatifs (*TOR*, *CIPK5* et *CIPK25*) et positifs (*BIG*, *CCT2*, *RRTF1*) du système de défense basal et de type NB-LRR d'*A. thaliana* ont été identifiés. De plus, deux des candidats régulés au niveau de la traduction durant la ETI, ne semblent avoir un impact significatif que sur la PTI : *LEA* et *TPR*.

Par la suite, à travers le clonage de la région transcrite, mais non traduite (UTR) de certains gènes candidats, nous avons tenté de caractériser le ou les mécanismes responsables de la régulation de leur traduction. Enfin, dans le but de déterminer si ce phénomène de régulation traductionnelle est conservé chez différentes espèces végétales, nous avons étudié l'expression de *BIG*, *TOR* et *CIPK5* après activation d'une protéine NB-LRR chez *N. benthamiana*. Même si les deux derniers volets de ce projet n'ont pas abouti à des résultats concluants, les nombreuses analyses menées ici ont permis de confirmer l'implication de plusieurs gènes candidats dans la résistance des plantes. De plus, cette étude a aussi permis d'identifier la reprogrammation de la traduction comme étant une étape clé à l'établissement d'une réponse de défense végétale efficace.

Mots-clés : Résistance végétale, Régulation post-transcriptionnelle, ETI, UTR

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Pr. Peter Moffett, l'Université de Sherbrooke, le Centre SÈVE, et tout autre organisme de financement qui ont permis la réalisation de mes projets de maîtrise. De plus, je souhaite remercier profondément les membres du laboratoire qui m'ont tous à leur façon apporté une aide cruciale aussi bien au niveau scientifique qu'humain. Ayooluwa Adurogbangba, Chantal Brosseau, Guilherme Silva Martins, Mathias Cohen, Geneviève Giroux, Matthieu Glanowski et Zhenxing Zhao : bien plus que des collègues, merci les amis.

Merci aux membres de mon comité de conseillers et évaluateurs, les professeurs Peter Moffett, Kamal Bouarab, Nathalie Beaudoin et Viktor Steimle pour toutes les discussions et conseils qui ont orienté mes projets de recherche durant ces deux années.

J'aimerais également exprimer ma profonde gratitude envers mes parents Mr et Mme Germain et Jasmine Barff, ma soeur Mateata Barff et Mr Terau Ena, qui m'ont toujours supportée dans mes choix. Sans eux, rien de tout ça n'aurait été possible. Finalement, merci à Romain Durand pour le soutien inébranlable dont il fait quotidiennement preuve à mon égard.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	xi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 LA PROBLÉMATIQUE DES AGENTS PHYTOPATHOGENES.....	1
1.2 L'IMMUNITÉ VÉGÉTALE.....	2
<i>1.2.1 Le système de défense basal des plantes</i>	<i>5</i>
1.2.1.1 Premier contact avec le pathogène : Les PRR	6
1.2.1.2 Cascade de signalisation	8
<i>1.2.2 Le système de défense enclenché par les effecteurs : ETI</i>	<i>10</i>
1.2.2.1 Les protéines NB-LRR	11
1.2.2.1.1 Interaction directe Avr-NB-LRR	12
1.2.2.1.2 Interaction indirecte NB-LRR/Avr.....	14
1.2.2.1.3 Le modèle du leurre.....	15
1.2.2.1.4 Le modèle du capteur intégré	16
1.2.2.1.5 Activation des protéines NB-LRR	18
1.2.2.2 La réaction d'hypersensibilité.....	20
1.3 TRANSCRIPTOME DE DÉFENSE D' <i>A. THALIANA</i>	20
1.4 LA TRADUCTION ET SA RÉGULATION	21
<i>1.4.1 Le mécanisme d'initiation de la traduction.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4.2 Facteurs d'initiation de la traduction</i>	<i>22</i>
1.4.2.1 eIF2	22

1.4.2.2 eIF4	24
1.4.3 <i>La régulation de la traduction</i>	26
1.4.3.1 Les sRNA.....	26
1.4.3.2 uORF	28
1.4.3.3 La voie TOR	30
1.5. <i>Traductome de défense d'A. thaliana</i>	31
1.6 PROJET DE MAÎTRISE	33
CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	39
2.1 CONDITIONS DE CROISSANCE DU SUPPORT VÉGÉTAL	39
2.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	39
2.2 CONDITIONS DE CROISSANCE DES SOUCHES BACTÉRIENNES	40
2.3 TEST DE RÉSISTANCE AUX AGENTS PATHOGÈNES.....	41
2.3.1 <i>Infection à Pseudomonas syringae DC3000</i>	41
2.3.2 <i>Infection à Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	41
2.3.3 <i>Infection à Plantago asiatica mosaic virus</i>	42
2.4 CLONAGE	42
2.5 EXTRACTION PHÉNOL-CHLOROFORME.....	45
2.6 ANALYSES PROTÉIQUES.....	46
2.6.1 <i>Agroinfiltration dans Nicotiana benthamiana</i>	46
2.6.2 <i>Immunobuvardage de type western</i>	46
2.6.3 <i>Quantification de la luciférase</i>	47
2.7 ANALYSE D'EXPRESSION GÉNIQUE	48
2.7.1 <i>Immunoprécipitation</i>	48
2.7.2 <i>Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative</i>	49
CHAPITRE 3: RÉSULTATS	51
3.1 FONCTION DES GÈNES CANDIDATS DANS LA RÉPONSE DE DÉFENSE.....	51

3.1.1 Fonction des gènes candidats dans le pathosystème <i>A.thaliana</i> - <i>P. syringae</i> DC3000.....	52
3.1.2 Fonction des gènes candidats dans le pathosystème <i>A. thaliana</i> - <i>H. a.</i>	53
3.1.3 Fonction des gènes candidats dans le pathosystème <i>A. thaliana</i> – <i>PLAMV</i>	57
3.2 RÉGULATION TRADUCTIONNELLE DES GÈNES CANDIDATS	60
3.2.1 Clonage des UTR.....	61
3.2.2 Quantification de l'expression de la luciférase	64
3.2.2.1 Région 5'UTR de CIPK5 et TOR.....	64
3.2.2.2 Site de liaison au miR5021	66
3.3 MAINTIEN DE LA RÉGULATION TRADUCTIONNELLE CHEZ <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	69
3.3.1 Homologues des gènes candidats chez <i>N. benthamiana</i>	70
3.3.2 Gènes de référence	71
3.3.3 Immunoprécipitation de l'ARN de <i>N. benthamiana</i>	73
3.3.4 Expression de gènes candidats chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	74
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	77
CHAPITRE 5: CONCLUSION GÉNÉRALE.....	87
BIBLIOGRAPHIE.....	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4E-BP: 4E- Binding Protein

35S : promoteur issu de l'ARN 35s du virus de la mosaïque du chou-fleur

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AGO : Argonaute

ARN: acide ribonucléique

ARNi : Système d'ARN interférent

ARNm: acide ribonucléique messenger

At: *Arabidopsis thaliana*

BAK1 : *Bri1-Associated Receptor Kinase 1*

CC: domaine N-terminal avec structure tridimensionnelle en hélice (*Coiled Coil*)

CC-NB-LRR : NB-LRR avec un motif CC en N-terminal

CCT2: *Phosphorylcholine Cytidylyltransferase 2*

CCR : domaine N-terminal des CCR-NB-LRR avec structure tridimensionnelle en hélice et homologie à RPW8

CCR-NB-LRR : NB-LRR avec un motif CCR en N-terminal

CIPK5: *CBL-Interacting Protein Kinase 5*

cm²: centimètre carré

DCL : *Dicer-like protein*

dpi : jour post-infection (*day post-infection*)

ETI: immunité médiée par un effecteur (*Effector-Trigered Immunity*)

FLS2 : *Flagellin Sensing 2*

GCN2 : *General Control Non-derepressible 2*

GUTT : Gène ayant une efficacité de traduction découplée de leur transcription (*Gene with Uncoupled Translation and Transcription*)

HR : réponse hypersensible (*Hypersensitive response*)

KO : *Knock-Out*

L : litre

LRR : domaine riche en répétitions leucines (*Leucin Rich Repeat*)

LEA: *Late Embryogenesis Abundant*

MAPK : protéine kinase activée par un mitogène (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

miRNA : micro ARN

MgCl₂ : chlorure de magnésium

mL : millilitre

mM : milimolaire

mTOR: Mammalian TOR

Nb : *Nicotiana benthamiana*

NB : domaine de liaison aux nucléotides (*Nucleotide Binding*)

NB-LRR : domaine de liaison aux nucléotides suivi d'un domaine riche en répétitions

ORF : cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame*)

p50 : fragment de la réplicase de TMV

PAMP : motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*Pathogen Associated-Molecular Pattern*)

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

PGN : *Pentatricopeptide repeat protein for Germination on NaCl*

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Recognition Receptors*)

PTI : immunité médiée par les PAMP (*MAMP-Triggered Immunity*)

PVX : virus X de la pomme de terre

pTA50 : lignée transgénique de *N. benthamiana* pTA50 et capable d'exprimer p50, sous un promoteur inductible à la dexaméthasone.

pTA50/L18: double transgénique de *N. benthamiana*

R: Résistance

RIN4 : *RPM1 interacting protein 4*

RISC : complexe d'ARN interférent

RPM1 : *Resistance to P. syringae* pv. *Maculicola*

RPS2: *Resistance to P. syringae*

RRTF1: *REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1*

RT-PCR : transcription inverse sur l'ARN suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne

RT-qPCR : transcription inverse sur l'ARN suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne quantitative

RT : réaction de transcription inverse (*Reverse Transcription*)

siRNA : *short interfering RNA*

T-DNA : acide désoxyribonucléique transféré

TE : Efficacité de traduction

TOR: *Target Of Rapamycin*

TPR: *Tetratricopeptide repeat-like*

TZF1: *THALIANA TANDEM ZINC FINGER PROTEIN 1*

TCTP: *TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN*

TMV : Virus de la mosaïque du Tabac

µg : microgramme

µL : microlitre

µM : micromolaire

WB : immunobuvardage de type western (*Western Blot*)

WT : type sauvage (*Wild Type*)

UFC : Unité formant colonie

uORF : *upstream ORF*

UTR : *Untranslated region*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Gènes testés ou mentionnés dans cette étude et le TE qui leur correspond	36
Tableau 2.1	Liste des lignées transgéniques <i>d'A. thaliana</i> testées lors des différentes infections	40
Tableau 2.2	Séquences des deux gBlocks générées pour le clonage des régions 5'UTR et 3'UTR des gènes candidats <i>LCR67</i> , <i>LEA</i> , <i>CIPK5</i> , <i>HBII</i> et <i>TOR</i>	43
Tableau 2.3	Amorces PCR utilisées pour l'amplification des régions UTR à partir des gBlocks et pour les analyses d'expression par qPCR	45

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Diagramme du cycle d'infection de <i>Pseudomonas syringae</i>	4
Figure 1.2	Le principe d'immunité végétale	5
Figure 1.3	Détection de PAMP par des PRR chez <i>A.thaliana</i>	7
Figure 1.4	Cascade de signalisation et événement précoce suivant l'activation des PRR	9
Figure 1.5	Structure linéaire typique d'une protéine NB-LRR	12
Figure 1.6	Détection des facteurs d'avirulence AvrRpt2, AvrRpm1 et AvrB par l'intermédiaire de RIN4.....	13
Figure 1.7	Différents modèles d'interaction Avr/NB-LRR	16
Figure 1.8	Le modèle du capteur intégré	17
Figure 1.9	Activation et transmission du signal des protéines NB-LRR	19
Figure 1.10	Mécanismes d'initiation de la traduction.....	24
Figure 1.11	Concept expérimental pour l'étude du traductome de défense de type NB-LRR	33
Figure 1.12	Analyse du transcriptome et traductome de défense d' <i>A. thaliana</i>	34
Figure 1.13	Identification des gènes contrôlés spécifiquement au niveau de la traduction lors de la réponse NB-LRR.....	35
Figure 3.1	Infection <i>Pseudomonas</i> sur de multiples lignées d' <i>A. thaliana knock out</i> pour des gènes candidats	54
Figure 3.2	Infection HpA Noco2 sur de multiples lignées KO d' <i>A. thaliana</i> pour une sélection de gènes candidats	56
Figure 3.3	Coloration au bleu de Trypan de feuilles de Col-0 et <i>cipk5</i> infectées à <i>H. a. Noco2</i> avec un inoculum proche de 4×10^5 spores/mL	56

Figure 3.4	Coloration au bleu de Trypan de plants infectés avec Hpa Noco2	57
Figure 3.5	Infection avec <i>H. a.</i> sur les mutants <i>lea</i> et <i>tpr</i>	58
Figure 3.6	Infection avec PLAMV AvrRpm1 de mutants d' <i>A. thaliana</i>	59
Figure 3.7	Infection avec PLAMV AvrRpt2 de mutants d' <i>A. thaliana</i>	60
Figure 3.8	Séquence de la région 5'UTR de <i>CIPPK5</i> chez <i>A. thaliana</i>	61
Figure 3.9	Séquence de la région 5'UTR de <i>TOR</i> chez <i>A. thaliana</i>	62
Figure 3.10	Stratégie de clonage In-fusion	63
Figure 3.11	Expression de la luciférase en condition de défense	65
Figure 3.12	Effet du miR5021 sur l'expression de la luciférase, avec infiltration du miR5021.....	67
Figure 3.13	Effet du miR5021 endogène, sur l'expression de la luciférase	68
Figure 3.14	Stabilité d'expression des gènes de référence	72
Figure 3.15	Migration d'ARN sur gel d'agarose	73
Figure 3.16	Expression relative de gènes candidats en condition de défense	75

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 La problématique des agents phytopathogènes

Un agent phytopathogène est un microorganisme susceptible d'infecter des végétaux et de causer des maladies nuisibles aux plants. Une infection, lorsqu'elle est accomplie, se présente sous la forme de symptômes qui peuvent affecter les différents organes de la plante. L'infection fructueuse de plants cultivés mène toujours à des conséquences importantes, soit la diminution du rendement, ou même la perte totale d'une récolte.

Ces agents nuisibles ne représentent pas un problème récent. En effet, voilà maintenant plusieurs années que ces agents pathogènes causent des dommages conséquents au monde de l'agriculture. Le chancre bactérien de la tomate par exemple est causé par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et représente un problème économique mondial depuis le milieu des années 1970 (Agrios, 2005). Les tâches et brûlures de céréales et herbes causées par *Pseudomonas* et *Xanthomonas*, ou encore la gale commune de la pomme de terre causée par *Streptomyces scabies* sont de très bons exemples de maladies d'origines bactériennes ayant de graves conséquences sur la culture de leurs hôtes (Agrios, 2005). Les bactéries ne sont pas les seuls microorganismes capables de provoquer des symptômes chez leurs hôtes d'origine végétale. Beaucoup de maladies d'origine virale ont été identifiées au cours des années. Le virus de la mosaïque du tabac par exemple est connu pour avoir un spectre d'hôte assez large, dont le tabac et d'autres Solanacées et pour causer des dégâts de grande importance économique (Agrios, 2005).

Les végétaux sont à la base de l'alimentation humaine et leur culture est un acteur économique important de toute société actuelle. Le Canada fait partie des plus grands exportateurs mondiaux de denrées agricoles et génère plus de 37 milliards de dollars US par année (FAO, 2016, Focus : Agriculture de conservation). À chaque espèce cultivée on dénombre 200 à 500 organismes nuisibles (virus, champignons et bactéries) dont les dégâts économiques causés

s'élèvent à des milliards de dollars par année dans le monde entier (FAO, 2016, Focus : Agriculture de conservation). Avec une population mondiale grandissante, il devient primordial de trouver une solution durable au danger que représentent ces microorganismes.

Il existe déjà de nombreuses méthodes pour lutter contre ce fléau. L'une des plus utilisées est le traitement aux pesticides, et autres produits chimiques. Cependant, au cours des dernières années, de nombreux scientifiques se sont penchés sur l'étude du métabolisme végétal, plus précisément sur tous les mécanismes naturels de défense des plantes. Ces études ont pour but d'identifier les processus de reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, les molécules de signalisation impliquées dans la résistance de l'hôte et finalement, comment les plantes éliminent les agents pathogènes. L'idée est de se concentrer sur les capacités de défense des plantes plutôt que sur la diminution de la population d'agents phytopathogènes. C'est ainsi que, grâce à des techniques d'analyses génétiques, génomiques et d'expression génique, de nombreux gènes impliqués dans la résistance des plantes ont été identifiés. Ces avancées ont permis une meilleure compréhension des voies de défenses des végétaux, tout ça dans le but de contribuer à la lutte contre les agents phytopathogènes.

1.2 L'immunité végétale

Pour persister dans un environnement hostile, les plantes ont développé un système de défense efficace contre différents agents pathogènes. Ce système peut être divisé en plusieurs étapes, la première est caractérisée par la détection de motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*). La reconnaissance des PAMP par des récepteurs (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) situés à la surface des cellules végétales, induit la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), ainsi qu'à d'autres phénomènes menant à la production de composés antimicrobiens, de dépôts de callose, etc. (Asai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015). Toutes ces réactions constituent la réponse de défense basale des plantes; la PTI (PAMP- *triggered immunity*) (Bigeard *et al.*, 2015). Au cours de l'évolution, certains microorganismes ont acquis la capacité de passer outre le système basal

de défense. En effet, les agents pathogènes spécialisés sécrètent des protéines capables d'inhiber l'effet de cette première barrière. Ces protéines portent plusieurs noms, « facteurs d'avirulence » lorsqu'elles sont reconnues par des protéines de résistance de l'hôte, « effecteurs », ou « effecteurs de type trois » lorsque sécrétées à travers un système de sécrétion de type III (T3SS). Ces derniers sont libérés dans le cytosol de la cellule hôte et agissent à différents niveaux pour minimiser l'effet de la PTI. Un des agents phytopathogènes bactériens les plus caractérisés est probablement *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000). Cette bactérie est un pathogène naturel de la tomate, du soya et du haricot (Keen, 1990), mais est capable d'infecter *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) en laboratoire. *Pto* DC3000 est un dérivé résistant à la rifampicine de *Pto* DC52 (Cuppels, 1986) et il est maintenant établi que ce dernier est capable de sécréter des effecteurs à travers un système de sécrétion de type III (Xin et He, 2013). Le pathosystème *A. thaliana*-*Pto* DC3000 a ainsi permis l'identification de nombreux effecteurs de type III dont AvrPto, AvrPtoB, HopF2, AvrB, AvrRpm1, AvrRpt2, etc. Comme la plupart des bactéries phytopathogènes, *Pto* DC3000 profite d'une blessure ou même de l'ouverture de stomates pour infecter son hôte et se multiplier dans l'apoplaste (Figure 1.1). D'autres microorganismes comme les champignons se propagent par le biais du prolongement d'un hyphes. L'évolution a aussi joué du côté opposé : les plantes aussi ont développé la capacité d'exprimer des protéines qui ciblent spécifiquement les protéines pathogéniques pour inhiber leur activité. Ces protéines, aussi appelées NB-LRR (*Nucleotide-Binding, Leucine-Rich Repeat*), sont encodées par des gènes de résistance (Figure 1.2). En réponse à la présence d'effecteurs relâchés par *Pto* DC3000, *A. thaliana* active une ou plusieurs protéines NB-LRR de manière spécifique à l'effecteur. Par exemple, AvrRpm1 et AvrRpt2 sont respectivement reconnus par les protéines de résistances; RPM1 et RPS2 (Gao *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2005). Leur activation enclenche une seconde barrière de défense qualitativement similaire à la PTI, mais plus rapide, plus intense et *in fine* plus efficace. Ce deuxième mécanisme de défense est nommé la ETI (*Effector-triggered immunity*) et résulte souvent en une mort cellulaire localisée (*Hypersensitive Response*; HR) (Collier *et al.*, 2011). La HR permet de limiter la propagation de l'agent infectieux.

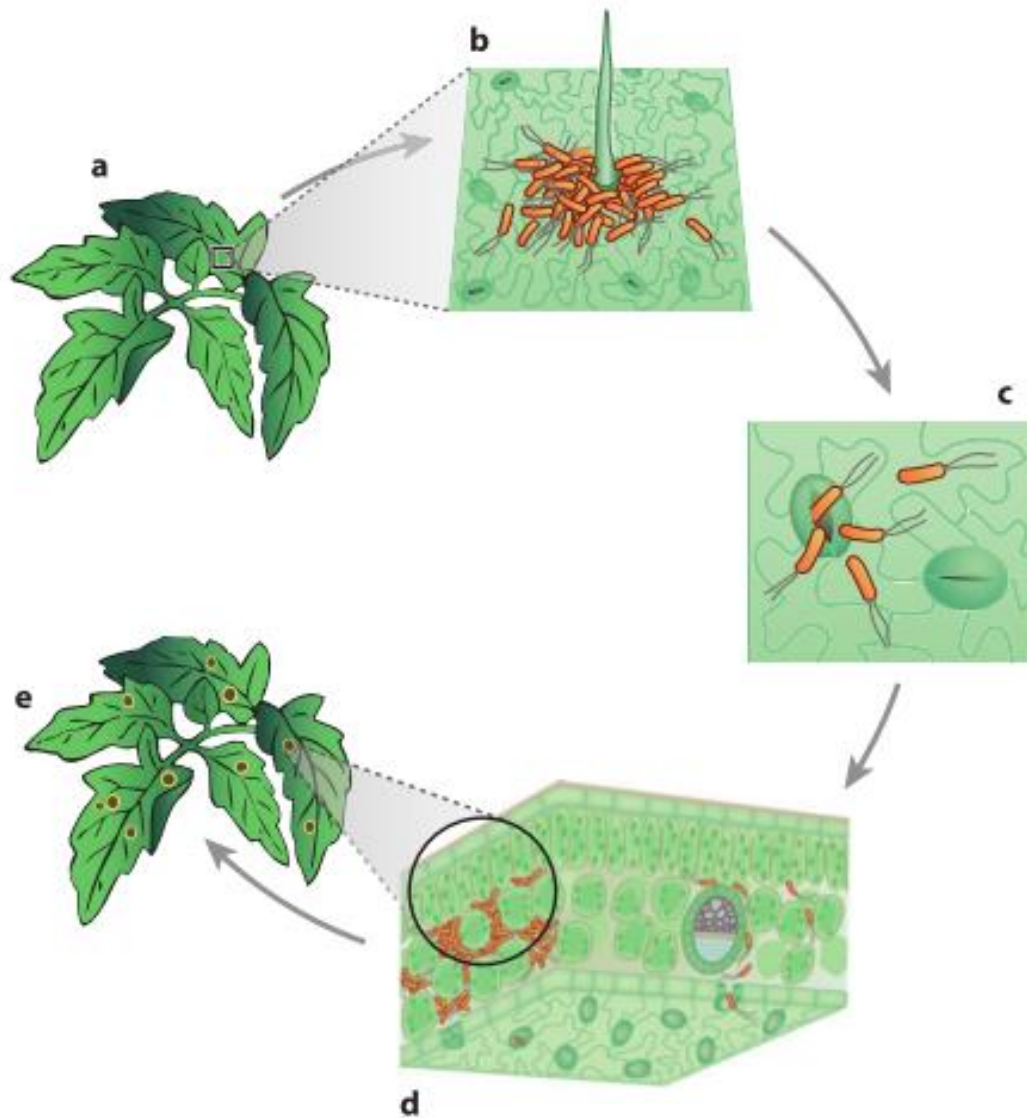


Figure 1.1 : Diagramme du cycle d'infection de *Pseudomonas syringae* (Tirée de Xin et He 2013)

(a) Feuilles de plant en santé. (b) Agglomérat de bactéries à la surface des feuilles. (c) Bactéries qui pénètrent dans la plante à travers des stomates. (d) Accumulation des bactéries dans l'apoplasme. (e) Chlorose associé à l'infection par *Pseudomonas syringae*.

1.2.1 Le système de défense basal des plantes

Comme décrit plus tôt, le système de défense basal des plantes repose sur la détection de signaux extérieurs à la cellule. Lesdits signaux se présentent sous la forme de motifs conservés et associés aux pathogènes. Ces derniers sont reconnus par des récepteurs de surface de natures variées, et enclenchent l'expression de gènes de résistances, la production de composés nocifs

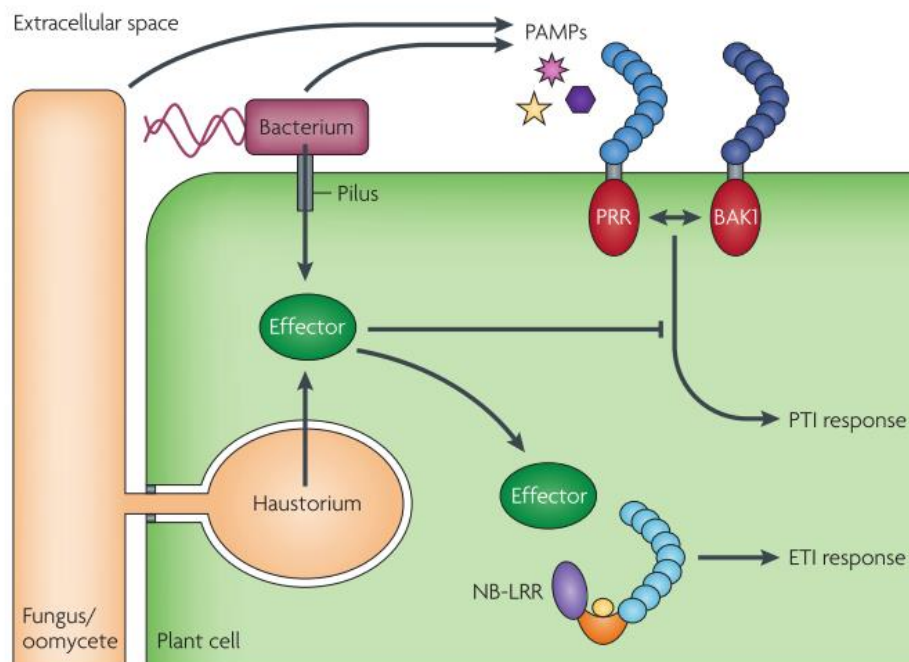


Figure 1.2 : Le principe d'immunité végétale (Tirée de Dodds et Rathjen, 2010). La première étape de défense est caractérisée par la détection de molécules libérées par les agents pathogènes dans les espaces extracellulaires, tels que les lipopolysaccharides, la flagelline et la chitine (PAMP), sont reconnues par les récepteurs de reconnaissance de formes de surface cellulaire (PRR) et déclenchent l'immunité médiée par les PAMP (PTI). Les PRR interagissent parfois avec des régulateurs de type kinase comme *Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Kinase 1* (BAK1) pour initier la PTI. Ces agents pathogènes peuvent être capables de sécréter des effecteurs dans la cellule hôte, soit à travers un système de sécrétion de type 3 (T3SS) dans le cas de bactéries, soit à travers un *haustorium* dans le cas d'oomycètes. Ces effecteurs ont pour but d'inhiber la PTI, mais peuvent dans certains cas être reconnus par des protéines de résistance de la plante, les protéines NB-LRR et induire la deuxième réponse de défense des plantes, la ETI.

aux microorganismes, le déploiement d'une barrière physique, etc (Figure 1.2). Ce phénomène est couramment appelé la PTI.

1.2.1.1 Premier contact avec le pathogène : Les PRR

La première étape du système de défense basal est la détection du pathogène à travers les PAMP. Cette reconnaissance passe par des récepteurs situés à la surface de la cellule hôte, les PRR qui peuvent être classés en fonction de leur nature. Certains d'entre eux possèdent une activité kinase, et d'autres ne sont que des protéines de type récepteur (*Receptor Like Protein*, RPL). La structure des PRR est assez conservée, ils possèdent un ectodomaine qui permet la liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytoplasmique pour les PRR de type kinase (Couto et Zipfel, 2016). Le domaine kinase sert à transmettre la perception du ligand et à enclencher la signalisation intracellulaire. Les RPL ne disposant pas d'activité kinase, s'associent avec des régulateurs de type kinase pour transmettre le signal (Gust et Felix, 2014). La nature de l'ectodomaine varie : pour la plupart il est composé d'une région LRR ((LRR)-PRR), mais il est aussi possible d'en retrouver de type lectine, ou encore avec un motif lysine (LysM) (Figure 1.3), ou ressemblant à un facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor-like*, EGF). Parmi les (LRR)-PRR d'*A. thaliana* on compte notamment FLS2, qui reconnaît la flagelline bactérienne flg22. Afin d'induire la PTI, FLS2 interagit avec BAK1 (*Bri1-Associated Receptor Kinase 1*, aussi connu sur le nom de SERK3) et des kinases de la famille des SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinases*) (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2013). En état latent, FLS2 s'associe avec un régulateur cytoplasmique de type kinase (RLCK), BICK1 (*Botrytis-Induced Kinase 1*) (Figure 1.3). Après détection de flg22, FLS2 s'associe avec BAK1 et phosphoryle BIK1, qui phosphoryle à son tour FLS2 et BAK1 avant de se dissocier du complexe FLS2/BAK1 (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). *A. thaliana* possède d'autres (LRR)-PRR, tel que le Récepteur EF-TU (EFR) et le Récepteur PEP 1 (PEPR1) qui reconnaissent respectivement l'épitope elf18 ou elf26 du Facteur d'Élongation TU (EF-Tu) (Figure 1.3) (Albert et Felix, 2010; Zipfel, 2014; Zipfel *et al.*, 2006), et AtPep1

(Zipfel, 2014). Comme FLS2, ces deux (LRR)-PRR sont associés à BAK1 et à BIK1 (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

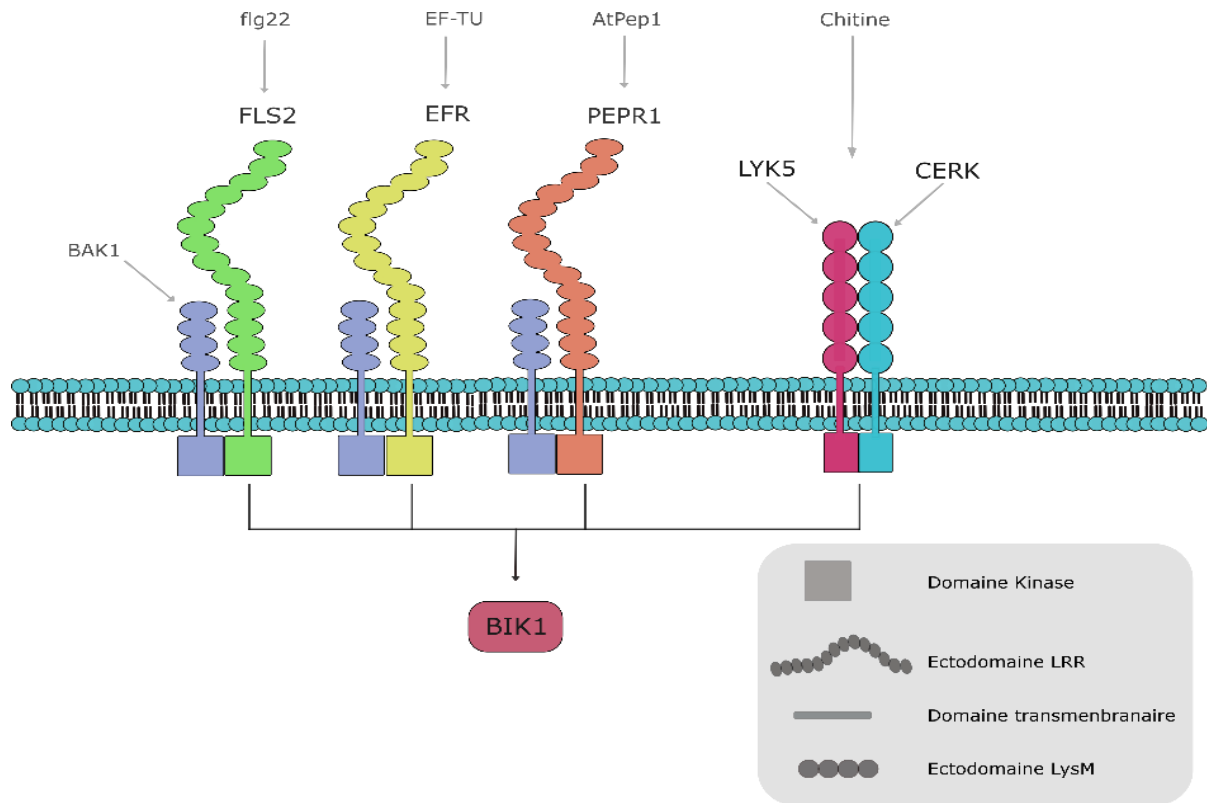


Figure 1.3: Détection de PAMP par des PRR chez *A. thaliana* (Adaptée de Couto et Cyril 2016).

Les PRR sont responsables de la détection de PAMP dans le but d'induire la PTI. Ces récepteurs sont généralement composés d'un domaine kinase cytosolique, un domaine transmembranaire et d'un ectodomaine extracellulaire de type LRR, comme c'est le cas pour FLS2, EFR et PEPR1 qui reconnaissent respectivement les PAMP, flg22, EF-TU et AtPep1. Ces PRR interagissent avec un récepteur de type kinase BAK1. Cependant, il est possible de retrouver des PRR avec un ectodomaine avec un motif LysM, comme c'est le cas pour LYK5 et CERK qui reconnaissent la chitine et qui forment un complexe pour induire la PTI. Afin de transmettre le signal d'induction de la PTI, ces récepteurs interagissent avec le régulateurs cytoplasmique BIK1.

Un dernier exemple intéressant serait celui de LYK5 un LysM avec récepteur de type kinase 5. LYK5 ainsi que CERK1 (*Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*), reconnaissent la chitine, constituant de la paroi des cellules fongiques. LYK5 et CERK1 forment un complexe

dépendant du ligand nécessaire à l'induction de la PTI (Figure 1.3). Tous les PRR cités plus tôt possèdent un domaine de type kinase. Dans le cas des RPL, ils s'associent en général avec un régulateur de type kinase dont le plus connu est SOBIR1 (*Suppressor Of BIR1-1*). Ces récepteurs sont la première ligne de détection de toute infection, leur activation mène à de nombreuses cascades de signalisation qui induisent des phénomènes énergivores. Pour cette raison, leur activation est régulée de par l'intervention de co-récepteurs tels que BAK1, SOBIR1, BIK1, etc. L'importance de ces récepteurs n'étant plus à démontrer, il est normal que ces derniers soient en retour ciblés par des effecteurs, empêchant ainsi le déclenchement de la PTI.

1.2.1.2 Cascade de signalisation

Suite à la détection d'un agent pathogène assurée par les PRR, une cascade de signalisation initie le système de défense basal des plantes. On observe alors une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} cytosoliques, ainsi qu'une production extracellulaire d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ces deux phénomènes sont les premiers détectables suite à l'induction de la PTI (Boller et Felix, 2009). Par la suite, une cascade impliquant des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) permet la transcription de gènes liés à la défense (Asai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015). On note aussi des changements de concentration d'hormones tels que l'éthylène (ET), l'acide jasmonique (JA) et l'acide salicylique (SA) (Knogge *et al.*, 2009). En générale, la production de SA est associée à la résistance à un agent pathogène biotrophe, alors que ET et JA eux sont impliqués dans la résistance à un agent pathogène nécrotrophe (Glazebrook, 2005). La production de ROS est essentielle à la fermeture des stomates empêchant ainsi l'entrée d'autres phytopathogènes. Après la perception de PAMP, BIK1, une kinase qui s'associe avec le complexe FLS2/BAK1 mentionné plus tôt, phosphoryle directement RBOHD (*Respiratory Burst Oxidase Homologous Protein D*), la NADH oxydase responsable de l'induction du phénomène et permettant la production de ROS (Figure 1.4). En plus de contrôler l'état de phosphorylation de RBOHD, BIK1 est aussi nécessaire à l'influx de Ca^{2+} (Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

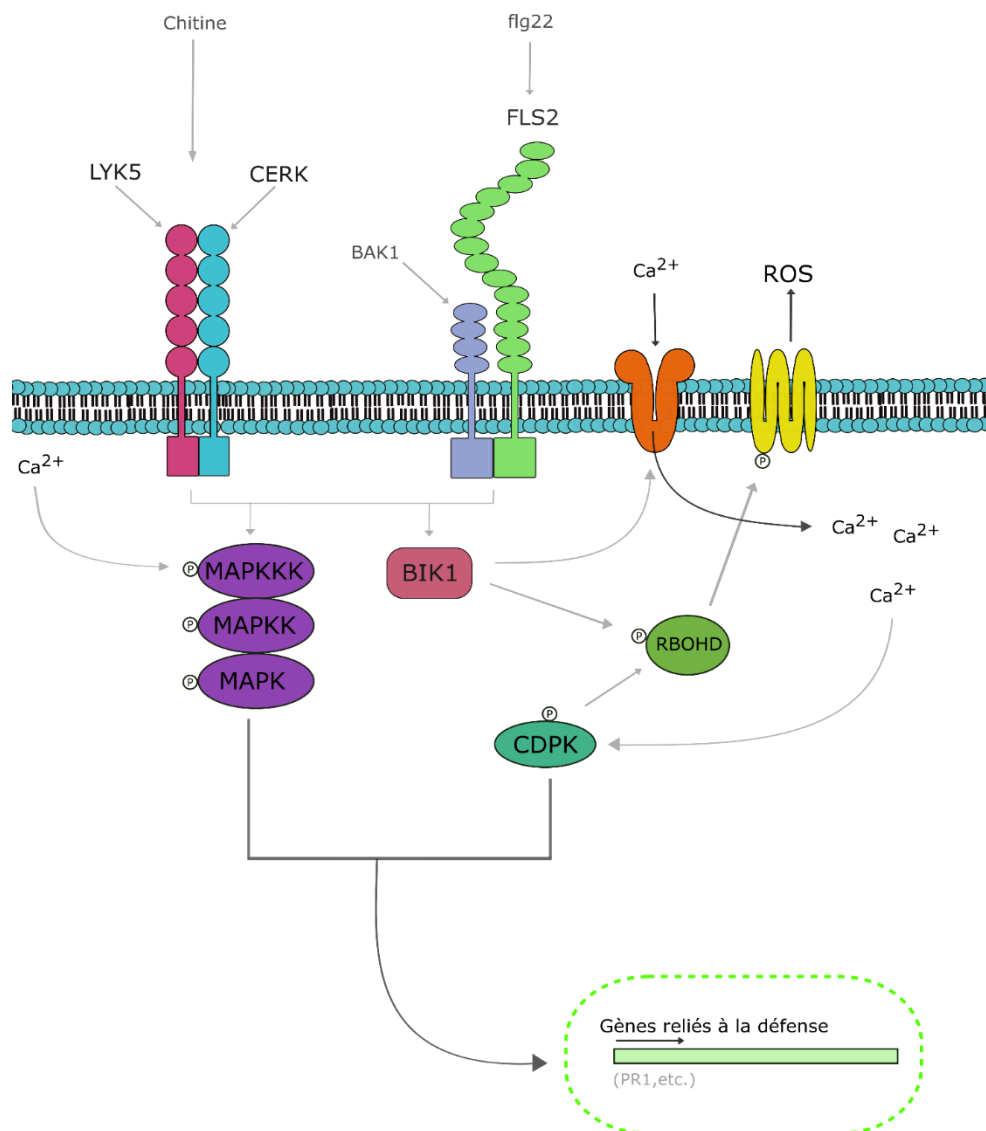


Figure 1.4 : Cascade de signalisation et événement précoce suivant l’activation des PRR (Adaptée de Couto et Cyril 2016). La perception de PAMP par les PRR enclenche une cascade de signalisation incluant celle des MAPK qui mène à l’expression de gènes nécessaire à la résistance de l’hôte. Le mécanisme par lequel la cascade des MAPK est induite suite à la perception de flg22 par FLS2 est encore inconnue, mais on sait que l’activation des MAPK après détection de la chitine nécessite l’intervention du régulateur cytoplasmique *PBS1-Like Kinase 27* (PBL27, non présenté sur cette figure). L’activation de BIK1 par les différents PRR, permet la phosphorylation de la NAHD oxydase RBOHD et enclenche donc la production de ROS. De plus, BIK1 est aussi requis à l’influx de Ca²⁺, qui à travers l’activation de la kinase dépendant de Ca²⁺, CDPK, permet l’expression de gène de résistance, et l’activation précoce de RBOHD.

Cet influx va quant à lui activer la CDPK, une kinase dépendante du Ca^{2+} ainsi qu'une cascade de MAPK, pour enfin entraîner l'expression de gènes de résistance (Boudsocq *et al.*, 2010) (Figure 1.4). CDPK joue aussi un rôle dans l'activation rapide des NADH oxydases responsables de la production de ROS tel que RBOHD (Kobayashi *et al.*, 2007). Les MAPK représentent aussi des acteurs importants de la PTI. Les *Mitogen activated kinase 3* (MPK3) et MPK6 sont activées par les MAPK kinases MKK4 et MKK5. S'en suit l'induction de facteurs de transcription responsables de la reprogrammation transcriptionnelle (Figure 1.4). Cette reprogrammation résulte en une production de composés antimicrobiens, d'enzymes, ou un dépôt de callose, etc (Asai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015). Ces réponses mènent ensemble à l'établissement de la PTI. Cependant, les phytopathogènes ayant évolué, ces derniers sont désormais capables de sécréter des protéines infectieuses dont le seul but est de perturber la PTI. En réponse à ça, les plantes ont développé la possibilité d'exprimer des protéines de résistance, activant ainsi une deuxième barrière de défense, la ETI.

1.2.2 Le système de défense enclenché par les effecteurs : ETI

Pour échapper à la première étape du système de défense des plantes, les microorganismes infectieux ont acquis la capacité de produire des effecteurs, ou facteurs d'avirulence, qui ciblent différentes étapes de la PTI. En effet, ces protéines peuvent aussi bien agir au niveau de la détection du pathogène, que dans les étapes qui en découlent. Dans une course à l'armement, les végétaux peuvent maintenant exprimer des protéines de résistance (protéines R). Ces protéines vont, de manière plus ou moins spécifique, détecter la présence d'un effecteur, ou surveiller toute perturbation de protéine ciblée par les effecteurs. L'activation de ces protéines induit un deuxième mécanisme de défense qu'est la ETI. Très curieusement, de nombreuses études se sont concentrées sur la caractérisation de plusieurs effecteurs, ainsi que sur l'identification de la protéine de résistance correspondante. Mais, à ce jour, très peu se sont attardées sur les mécanismes moléculaires de défense qu'enclenche l'activation des protéines

R. Nous savons cependant que la ETI est qualitativement similaire à la PTI, si ce n'est qu'elle est plus efficace (Tao *et al.*, 2003).

1.2.2.1 Les protéines NB-LRR

Actrices principales de la voie de défense ETI, les protéines NB-LRR sont composées de deux domaines principaux : la région de liaison aux nucléotides composée des domaines ARC (Apaf-1, R protéine, et CED4) et NB (*Nucleotide Binding*) et de la région LRR (*Leucine Rich Repeat*) (Van der Biezen et Jones 1998). NB-ARC est un domaine conservé contrairement au domaine LRR qui est plus variable, attribut qui influe sur la reconnaissance spécifique des effecteurs (Collier et Moffett, 2009). Ces protéines, codées par les gènes de résistance de la plante, peuvent être séparées en trois familles selon la présence d'un domaine, lequel est prédit d'adopter une forme *Coiled-coil* (CC) ou *Toll and Interleukin-1 receptors* (TIR) en N-terminal (Meyers *et al.*, 1999) (Figure 1.5). Toutefois, les CC-NB-LRR ne possèdent que très peu de similarités au niveau de la séquence de leur région N-terminale. Le seul motif conservé est « EDVID », une séquence de 110 à 130 résidus en N-terminale qui caractérise à lui seul la classe des CC. Cependant, il existe des exceptions, NRG1 est un bon exemple de « non-EDVID-CC-NB-LRR ». Les NRG1-like et les ADR1-like constituent une famille appelée les CC_R. Les CC_R-NB-LRR contrairement aux deux autres familles de NB-LRR ne reconnaissent pas des protéines pathogéniques, mais seraient plutôt des adjuvants de NB-LRR et agiraient dans la cascade de signalisation de défense induite par l'activation d'une NB-LRR (Collier *et al.*, 2011). Même si les membres de cette famille de protéines NB-LRR endogènes de toutes les angiospermes ne sont pas des protéines de résistance en tant que telles, elles sont nécessaires au fonctionnement du TIR-NB-LRR N (Collier et Moffett, 2009). Comme mentionné plus tôt, ces protéines ont pour rôle de détecter les effecteurs / facteurs d'avirulence (Avr) afin de déclencher la ETI. Étant donnée la variabilité du domaine LRR, il a été suggéré que cette région est responsable de la détection de leur cible. En effet, dans l'interaction directe de la protéine NB-LRR Pi-ta (*Oryza sativa*) avec AvrPi-ta (*Magnaporthe grisea*), la présence du domaine LRR de Pi-ta seul est suffisante pour permettre le contact entre les deux partenaires (Yulin *et*

al., 2000). Cependant, plusieurs équipes se sont concentrées sur les mécanismes d'activation des protéines R et beaucoup ont observé l'absence de liaison directe entre les deux protéines. L'hypothèse d'un intermédiaire présent pour médier l'activation des NB-LRR fut alors émise.

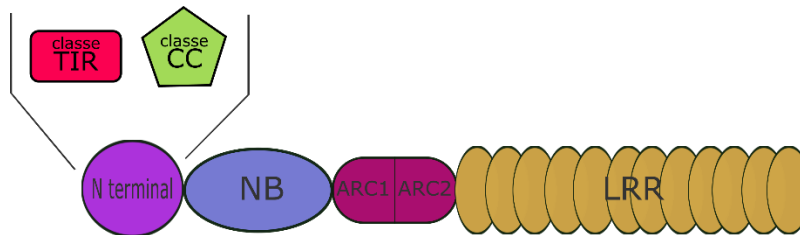


Figure 1.5 : Structure linéaire typique d'une protéine NB-LRR (Adaptée de Collier et Moffett 2009)

1.2.2.1.1 Interaction directe Avr-NB-LRR

Il existe plusieurs exemples de liaison directe entre une protéine NB-LRR et le facteur d'avirulence correspondant (Figure 1.7). Les AvrL de la rouille du lin sont directement reconnus par les protéines NB-LRR L de *Linum usitatissimum*. En effet, Dodds *et al.* (2006) ont observé cette interaction directe par des essais double hybride. Il est connu que le locus polymorphique de L codant pour des NB-LRR comporte 12 variants alléliques capables de cibler des Avr spécifiques (Ellis *et al.* 1999). De plus, les auteurs ont identifié 12 variants alléliques d'*AvrL567* chez 6 souches de rouille du lin. Leurs résultats montrent que 6 variants d'*AvrL567* sur 12 induisent une HR dépendamment de la présence de L5, L6 et L7. Ils prouvent ainsi que les divergences alléliques d'*AvrL567* mènent à des différences de spécificité au niveau de la reconnaissance par leurs protéines R. Cet article nous fournit un exemple concret de sélection imposée par les gènes R entraînant la diversité alléliques d'*AvrL567* dans le cadre d'une course à l'armement « gène-pour-gène ». Le pathosystème *Magnaporthe grisea* (champignon) / *Oryza sativa* (Riz) a été largement étudié, et présente plusieurs exemples

d'interaction directe entre protéine R et Avr. C'est le cas de l'*AvrPi-ta* dont l'interaction directe par Pi-ta a été observée par des essais double hybride. Jia *et al.* (2000) ont démontré la liaison spécifique entre *AvrPi-ta* et le domaine LRR de Pi-ta, et ce, par des analyses de *far-western* effectuées avec une protéine recombinante Pi-ta LRD. Ce même agent pathogène possède aussi le gène codant pour Avr-Pik qui interagit directement avec l'extrémité N-terminale de Pik1 incluant son domaine CC (Kanzaki *et al.*, 2012). Ces deux exemples illustrent bien deux cas de liaison protéine-ligand qui impliquent des domaines différents des protéines R, et de ce fait, deux mécanismes d'action différents.

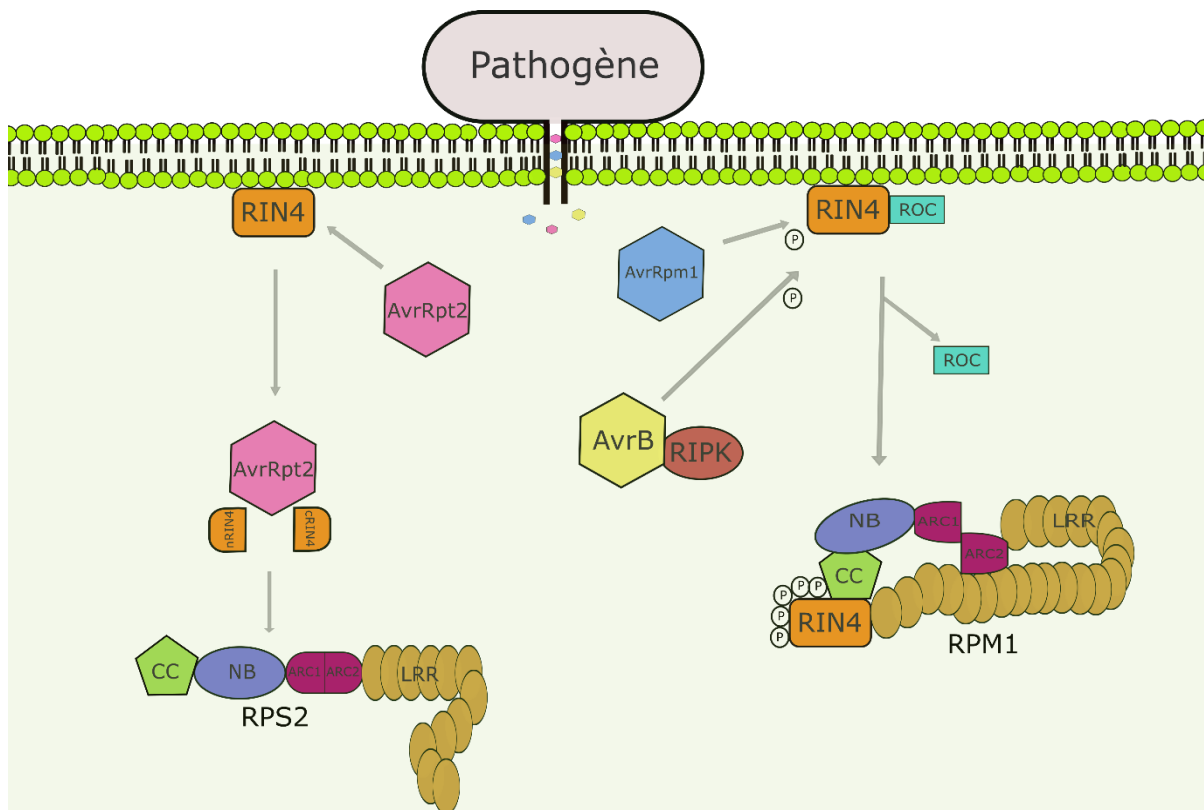


Figure 1.6 : Détection des facteurs d'avirulence AvrRpt2, AvrRpm1 et AvrB par l'intermédiaire de RIN4. Les effecteurs AvrB, AvrRpt2 et AvrRpm1 de *P. syringae* sont sécrétés dans la cellule hôte. Ces trois effecteurs ont tous pour cofacteur RIN4, dont la perturbation va activer les protéines NB-LRR correspondant à chaque effecteur. Le clivage de RIN4 induit par l'activité cystéine protéase d'AvrRpt2 va être détecté par RPS2. AvrB lui va interagir avec RIPK et être relocalisé au niveau de la membrane où avec AvrRpm1 ils vont phosphoryler RIN4. L'état phosphorylé de RIN4 va activer la protéine NB-LRR, RPM1 et induire la ETI.

1.2.2.1.2 Interaction indirecte NB-LRR/Avr

La seconde hypothèse d'activation des NB-LRR implique un intermédiaire; un cofacteur. Un cofacteur est une composante endogène affectée par l'action d'Avr, et dont la modification qui s'ensuit serait détectée par la protéine NB-LRR correspondante (Figure 1.7). Il existe deux variations de ce modèle, (1) le cofacteur est constitutivement lié à la protéine R, (2) la protéine R ne se lie avec le cofacteur que lorsque ce dernier est lié à l'Avr (Dangl et Jones, 2001; Van der Biezen *et al.*, 1998).

L'exemple le plus documenté est sans doute celui du cofacteur RIN4 (*RPM1 interacting protein 4*) d'*A. thaliana* qui est associé de manière constitutive aux protéines de type CC-NB-LRR, RPM1 (*Resistance to P. syringae* pv. *Maculicola*) et RPS2 (*Resistance to P. syringae*). Ces trois protéines sont associées à la membrane plasmique. RIN4 est ciblé par 3 différents effecteurs de *P. syringae*, AvrRpt2 qui enclenche RPS2, AvrRpm1 et AvrB qui enclenchent RPM1. RPS2 est activée suite au clivage de RIN4 dû à l'activité cystéine protéase d'AvrRpt2 (Figure 1.6). Une étude sur la structure et la fonction de RIN4 suggère qu'il maintient RPS2 dans un état inactif jusqu'à l'intervention d'AvrRpt2 (Day *et al.*, 2005). AvrB et AvrRpm1 subissent une acétylation et interagissent avec des kinases comme RIPK, etc (Liu *et al.*, 2011) puis sont relocalisés au niveau de la membrane plasmique pour induire la phosphorylation de RIN4 (Nimchuk *et al.*, 2000) (Figure 1.6). Le cofacteur RIN4 est aussi requis pour inhiber l'autoactivation de RPM1, même si elle n'est que minimale (Belkadir *et al.*, 2004). En l'absence d'agent pathogène, RIN4 est un régulateur négatif de la PTI, des lignées le surexprimant sont significativement plus susceptibles à *Pto* DC 3000, tandis que les lignées KO montrent un niveau de PTI augmenté (Belkadir *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005a).

Un autre cas intéressant serait celui de l'Avr P50 du *Tobacco mosaic virus* (TMV) et de sa protéine TIR-NB-LRR N de *Nicotiana glutinosa*. Il a tout d'abord été supposé que le domaine hélicase de p50 se liait directement au domaine TIR de N (Ueda *et al.*, 2006). Par la suite, il a

été démontré que p50 nécessite l'intervention de *N receptor-interacting protein 1* (NRIP1), une protéine chloroplastique (Caplan *et al.*, 2008). NRIP1 est normalement localisée dans le chloroplaste, mais par un mécanisme inconnu est transportée au cytoplasme et dans le noyau, où elle interagit avec p50. Cette seconde hypothèse est un bon exemple de cofacteur lié à l'effecteur et non à la protéine R.

1.2.2.1.3 Le modèle du leurre

Plusieurs études se sont concentrées sur les mécanismes d'activation des NB-LRR, dans le cas d'interaction indirecte. Beaucoup sont parvenues à identifier le cofacteur ciblé par l'Avr qui va médier la liaison à la protéine R. Beaucoup de ces cofacteurs identifiés n'ont pas de rôle connu dans le mécanisme de défense. C'est ainsi que le modèle du leurre est né. Selon cette hypothèse, certains cofacteurs visés par les Avr auraient des similarités avec des cibles de virulence, mais n'en sont pas en tant que telles (Van Der Hoorn et Kamoun, 2008) (Figure 1.7). L'exemple le plus connu est celui de Pto, une protéine kinase de la tomate (*Solanum lycopersicum*) ciblée par AvrPto et AvrPtoB, deux effecteurs de *P. syringae* pv. *tomato*. Ces deux Avr sont transportés dans la cellule hôte où ils interfèrent avec le domaine kinase de plusieurs PRR, dont EFR et FLS2 (Xiang *et al.*, 2008) et de BAK1 (Cheng *et al.*, 2011) pour inhiber la PTI. Pto est constitutivement lié à la protéine CC-NB-LRR Prf, toute altération du complexe Pto-Prf mène à une HR (Mucyn *et al.*, 2006). Au départ, Pto était considérée comme la protéine R responsable de l'induction de la ETI. Après avoir mis en lumière la nécessité de Prf et son rôle, on se questionne alors sur la réelle fonction de Pto dans la réponse de défense. Pourquoi les Avr cibleraient-ils une protéine endogène n'ayant aucun intérêt de virulence, et qui déclenche la ETI ? Fait intéressant, le domaine BAK1 qui interagit avec AvrPtoB possède des similarités structurelles avec le domaine de Pto qui interagit avec AvrPtoB (Cheng *et al.*, 2011). AvrPto cible donc trois protéines de l'hôte, EFR, FLS2 et Pto tandis que, AvrPtoB cible BAK1 et Pto. Il est tentant de penser que Pto agirait comme un leurre, ayant développé des similarités avec les cibles de virulence d'AvrPto et AvrPtoB dans le but d'activer la réponse de type NB-LRR.

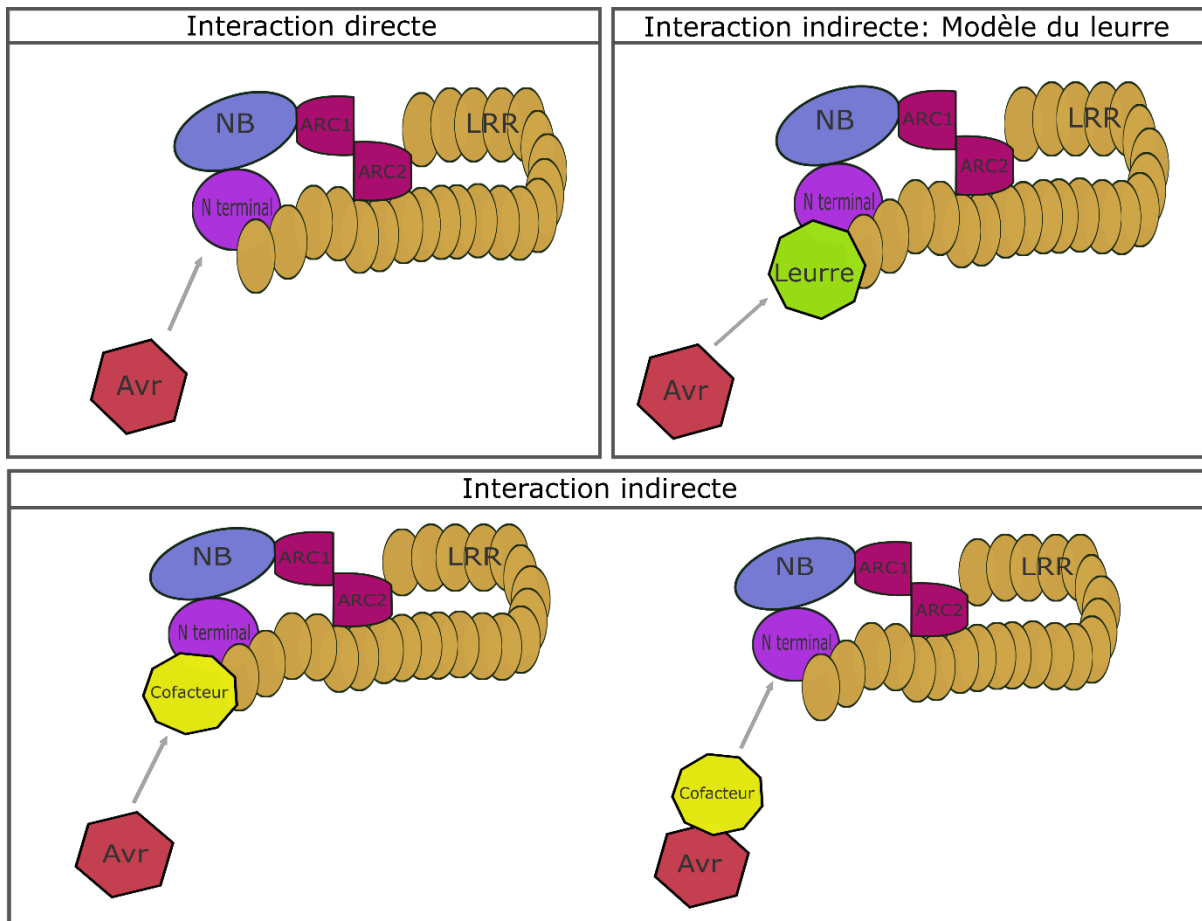


Figure 1.7 Différents modèles d'interaction Avr/NB-LRR. Illustrés ici les différents scénarios d'interaction entre une protéine NB-LRR et un Avr; Le premier cas permet l'interaction directe de l'Avr avec la protéine NB-LRR. Le second fait intervenir un leurre qui va servir d'appât à l'Avr. Enfin le troisième scénario fait intervenir un cofacteur qui va médier l'interaction entre l'Avr et la protéine NB-LRR.

1.2.2.1.4 Le modèle du capteur intégré

Au cours des dernières années, un certain nombre d'Avr se sont avérés être ciblés non pas par un NB-LRR spécifique, mais par une paire de protéines NB-LRR (Eitas et Dangl, 2010). Ce mécanisme semble être conservé à travers les végétaux puisqu'il est impliqué dans la résistance contre les virus, bactéries, champignons et oomycètes dans les monocotylédones et

dicotylédones (Cesari *et al.*, 2014). RPS1 et RPS4, sont des TIR-NB-LRR d'*A. thaliana* nécessaires à la détection d'AvrRps4 de *P. syringae* et de PopP2 de *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2003; Narusaka *et al.*, 2009). RPS1 possède un domaine WRKY en C-terminal auquel se lient AvrRps4 et PopP2 (Deslandes *et al.*, 2003; Tasset *et al.*, 2010). Quant à RSP4, une mutation dans son domaine TIR qui renforce son homodimérisation entraîne une autoactivation menant à la mort cellulaire. Ce phénomène est inhibé lorsque co-exprimé avec le domaine TIR de RPS1 (Williams *et al.*, 2014). RGA4 et RGA5, deux CC-NB-LRR du riz, sont nécessaires à la détection de Avr-Pia et Avr-CO39 de *Magnaporthe oryzae*. Les deux Avr ne se lient pas à RGA4, mais à RGA5 qui a un domaine RATX1 associé aux métaux lourds en C-terminal, identifié comme domaine liant les effecteurs (Cesari *et al.*, 2013). L'expression de RGA4 seul dans *N. benthamiana* induit la mort cellulaire, et la coexpression de RGA4 et RGA5 en l'absence de pathogène inhibe l'autoactivation de RGA4.

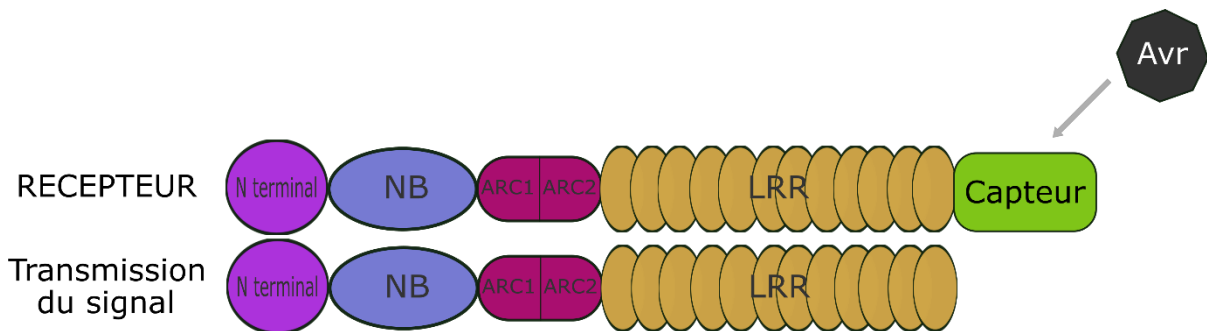


Figure 1.8: Le modèle du capteur intégré

Ce système partage d'importantes similarités avec le modèle RPS1/RPS4. Il a donc été proposé que chaque NB-LRR possède un rôle différent. RPS4 et RGA4 déclenchent le signal menant à la résistance, tandis que RPS1 et RGA5 agissent en tant que récepteurs d'effecteurs tout en réprimant l'autoactivation de leur partenaire respectif (Cesari *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2014). De ces exemples a découlé un nouveau modèle proposé par Cesari *et al.* (2014) et Wu *et al.* (2015). Selon ce modèle, dans le cas d'une paire de NB-LRR, un domaine de grande variabilité est intégré, chez une des deux protéines et sert de cible aux effecteurs. Étant données les similarités de ces cibles avec des protéines impliquées dans la réponse de défense, Cesari

et al. (2014) suggèrent que ces régions ne seraient que des leurres, tandis que Wu *et al.* (2015) introduisent le terme de « domaine capteur intégré » (Figure 1.8). Ils se basent sur le fait que, en plus de servir de substrat et de cible aux effecteurs, le domaine capteur possède une activité biochimique qui serait modulée par les effecteurs.

1.2.2.1.5 Activation des protéines NB-LRR

Jusqu'à maintenant, de nombreux modèles très différents de détection de NB-LRR ont été décrits, mais le mécanisme précis d'activation des NB-LRR et la transduction du signal qui s'en suit sont peu compris. Pour l'instant nous savons que le domaine N-terminal est un point important d'interaction avec les Avr et le domaine LRR est le premier déterminant de reconnaissance spécifique des Avr. De plus, Collier et Moffett (2009) proposent que la région LRR détermine quelle interaction initiera une réponse de défense. Les auteurs suggèrent un modèle d'activation et de transmission du signal des NB-LRR (Figure 1.9). (1) La protéine NB-LRR est dans un état autoinhibé, elle est compétente au niveau de la signalisation, mais reste inactivée : l'interrupteur est sur « OFF ». Cet état latent nécessite une boîte liant les nucléotides fonctionnels qui permettraient de lier l'ATP ou l'ADP, et une interaction stable des domaines LRR et ARC2. La liaison au cofacteur pourrait être requise dans certains cas pour maintenir la compétence signalétique. (2) L'Avr interagit avec le cofacteur/leurre et perturbe la protéine NB-LRR, l'interrupteur est sur ON. Cette interaction perturbe l'interface de liaison du domaine LRR et ARC2. Ce changement modifie, à travers ARC2, le statut de liaison de la boîte liant les nucléotides, menant ainsi à l'initiation du signal, libérant possiblement un motif de signalisation dans le domaine NB. (3) Les interactions intramoléculaires de la protéine sont dissociées et elle est réinitialisée. Elle se positionne de nouveau dans son état premier de latence compétente, prête à être réactivée par d'autres Avr.

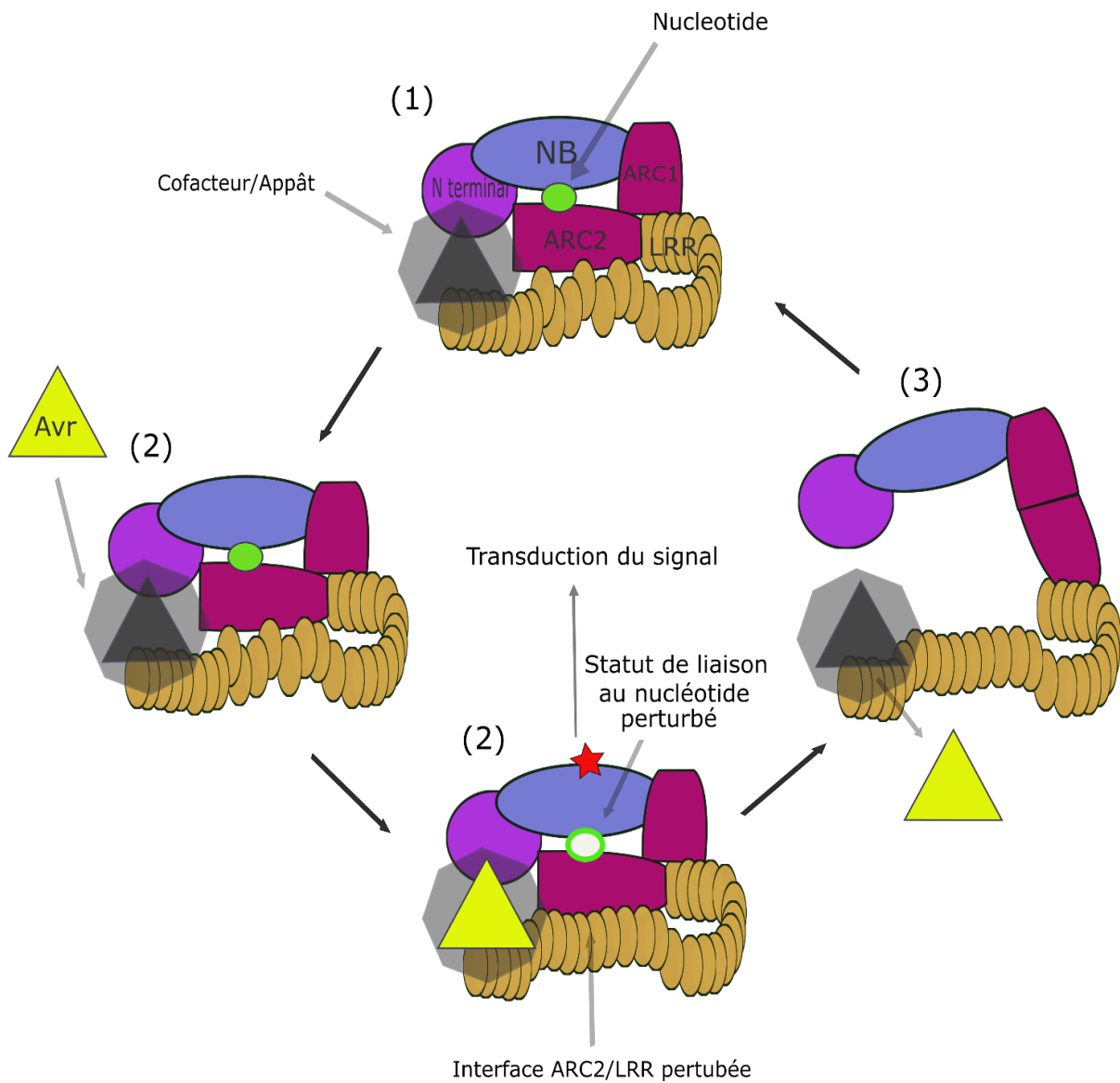


Figure 1.9: Activation et transmission du signal des protéines NB-LRR (Adaptée de Collier et Moffett 2009) (Voir texte pour détails)

1.2.2.2 La réaction d'hypersensibilité

La sécrétion d'effecteurs dans le cytosol de la cellule hôte et l'activation de la protéine NB-LRR correspondante mène à une seconde voie de défense, la ETI. La détection d'effecteurs, ainsi que l'activation des protéines NB-LRR ont été décrites précédemment. La ETI est connue pour être quantitativement différente à la PTI plutôt que qualitativement, à une différence près. En effet, la ETI mène souvent, mais pas toujours, à un phénomène de mort cellulaire localisée nommé la réaction d'hypersensibilité (HR). Il s'agit d'un type de mort cellulaire qui se distingue par son aspect morphologique spécifique à la HR, c'est-à-dire le rétrécissement du cytoplasme, la condensation de la chromatine et dans les étapes finales, la perturbation des chloroplastes et la vacuolisation (décrit dans Mur *et al.*, 2008). Comme chez les animaux, la HR nécessite l'accumulation de ROS, et est régie par les Métacaspases de type 1 sous forme active (Coll *et al.*, 2011). Or il a été montré qu'avec des mutants pour ces métacaspases, la résistance est toujours en place, tandis que la HR est supprimée (Nuria *et al.*, 2010). Dans la même optique, Bhattacharjee *et al.* (2009) ont montré que l'expression de la protéine N par p50 chez *N. benthamiana* cause une réponse antivirale, mais ne provoque pas de HR. Cela suggère que les protéines NB-LRR n'induisent pas automatiquement la HR, et que celle-ci n'est pas indispensable à la résistance. Les protéines NB-LRR pourraient donc agir dans deux voies différentes, la ETI et celle induisant la HR.

1.3 Transcriptome de défense d'*A. thaliana*

Afin d'élucider les mécanismes moléculaires engendrés lors d'une interaction compatible ou incompatible, de très nombreux groupes se sont penchés sur le profil d'expression génique d'*A. thaliana* dans les deux conditions. Ces études reposent sur le principe que la détection d'agents pathogènes provoque la reprogrammation transcriptionnelle de la cellule hôte, menant ainsi à l'expression de gènes nécessaires à la résistance. Suite à toutes ces recherches, il est maintenant possible de trouver des données de transcriptomiques pour presque tous les pathosystèmes (Katagiri, 2004). Les résultats obtenus suite à ces analyses pointent tous vers la même

conclusion : la différence d'expression entre les deux mécanismes n'est pas qualitative, mais quantitative. En effet, certaines équipes se sont intéressées à l'expression de gènes de défense spécifiques et ont montré que l'expression de ces derniers est conservée dans les deux voies (Kiedrowski, *et al.*, 1992; Lamb *et al.*, 1993). Ce phénomène peut être étendu à tout le génome, le même groupe de gènes est exprimé ou inhibé durant la PTI et la ETI, mais à intensité différente (Tao *et al.*, 2003). De plus, le profil d'expression observé chez *A. thaliana* semble être qualitativement conservé dans différents pathosystèmes (Katagiri, 2004). De ces résultats en découle un constat très surprenant : jusqu'à maintenant, très peu de gènes fonctionnellement impliqués dans la ETI ont été trouvés. Il reste toujours l'exemple de *RIPK* qui fut identifié comme exprimé à la hausse lors d'une infection par un pathogène avirulent (Torres *et al.*, 2003). Par la suite, une fonction dans la voie de défense de type NB-LRR lui a été attribuée. Comme mentionné plus tôt, après la détection des Avr AvrB et AvrRpm1, RIPK phosphoryle RIN4 et active la protéine R, RPM1 (Liu *et al.*, 2011). Il semble nécessaire d'établir un lien entre la régulation des gènes induite suite à une infection, et la fonction de ces derniers dans la réponse de défense de type NB-LRR. Pour ça, il serait pertinent de s'intéresser au traductome immunitaire d'*A. thaliana*.

1.4 La traduction et sa régulation

1.4.1 Le mécanisme d'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction commence par une lecture de l'ARNm jusqu'à la détection du codon d'initiation (AUG), pour enfin poursuivre avec la phase d'élongation (Figure 1.10). La première étape est la formation d'un complexe tertiaire entre l'ARNt initiateur (Met-ARNti) et eIF2 lié à du GTP. Ce complexe tertiaire se lie à la sous-unité ribosomale 40S. Cette réaction nécessite l'intervention de plusieurs autres facteurs d'initiation, dont eIF1, eIF1A, eIF5 et eIF3, ce qui permet la formation du complexe de pré-initiation (PIC). La seconde étape est la liaison de PIC à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm. PIC parcourt l'UTR à la recherche du premier codon

d'initiation AUG complémentaire à celui de Met-ARN^{ti}. Il arrive que les séquences avoisinantes ne soient pas favorables à l'initiation, dans ce cas le codon est évité jusqu'à la rencontre d'un AUG positionné dans un cadre favorable. La présence du consensus de Kozak encourage grandement la sélection du codon. Après détection du codon, on observe l'hydrolyse du GTP, la libération de GDP-eIF2, et le recrutement de la grande sous-unité ribosomale 60S pour former le complexe d'initiation 80S. GDP-eIF2 est recyclé en GTP-eIF2 par eIF2B. En amont de toutes ces réactions, l'ARN^m est pré-activé à l'aide du dimère eIF4G-eIF4E. eIF4G, eIF4A et eIF4B vont permettre la liaison de la queue poly(A), alors qu'eIF4E va lier la coiffe permettant ainsi la circularisation de l'ARN^m. La pré-activation de l'ARN^m est ATP-dépendante. Cette étape est nécessaire car elle permet le déroulement de la structure secondaire du 5'UTR (décrit dans Jackson *et al.*, 2010; Sanfaçon, 2015; Sonenberg et Dever, 2003). En plus de ce mécanisme d'initiation, certains ARN^m passent par une voie alternative qui ne nécessite pas de coiffe, mais des IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*).

1.4.2 Facteurs d'initiation de la traduction

1.4.2.1 eIF2

Comme mentionné plus tôt, eIF2 est responsable du recrutement de l'ARN^t initiateur, Met-ARN^{ti}. Lié au GTP, eIF2 forme un complexe tertiaire qui va ensuite établir le PIC après ajout de la sous-unité ribosomale 40S. Suite à la détection du codon d'initiation, l'hydrolyse du GTP libère eIF2-GDP. Ce nouveau duplexe est recyclé par eIF2B en eIF2-GTP pour permettre le recrutement d'un autre Met-ARN^{ti}. Le facteur eIF2 est une cible de choix pour la régulation de la traduction. Il est phosphorylé par différentes kinases, très souvent au résidu Ser51 de sa sous-unité α , ce qui inhibe la dissociation de eIF2B. L'appauvrissement en eIF2B libre a pour effet l'arrêt de l'initiation de la traduction (Kimball, 1999). Chez les animaux, de nombreuses kinases à eIF2 α ont été identifiées : parmi ces dernières on compte notamment PKR (*Protein Kinase RNA-dependent*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) et GCN2 (*General*

Control Non-derepressible 2). PKR est activée par de l'ARN double brin de plus de 40 pb et joue un rôle important dans la réponse antivirale. PERK est activée par le stress induit au réticulum endoplasmique (RE), lui-même causé par le mauvais repliement protéique à l'intérieur du RE. Enfin, GCN2 est activée par le manque de nutriments, durant les réponses immunitaires, et par le mauvais repliement de protéines. Il s'agit du seul homologue ayant été identifié chez *A. thaliana*. Plusieurs études ont observé l'activation de AtGCN2 suite à différents stress, tels que l'exposition aux UV, le manque d'acides aminés, les blessures ou encore le stress oxydatif (Lageix *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017). De plus, Liu *et al.* (2015) ont montré que les plants *gcn2* présentent une résistance accrue au nécrotrophe *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* ainsi qu'au biotrophe *Golovinomyces cichoracearum* tandis qu'ils arborent une grande susceptibilité à *Hyaloperonospora arabidopsidis* et *Golovinomyces cichoracearum*. En plus des chocs abiotiques, AtGCN2 semble donc être nécessaire à l'immunité végétale même si son rôle reste à déterminer.

1.4.2.2 eIF4

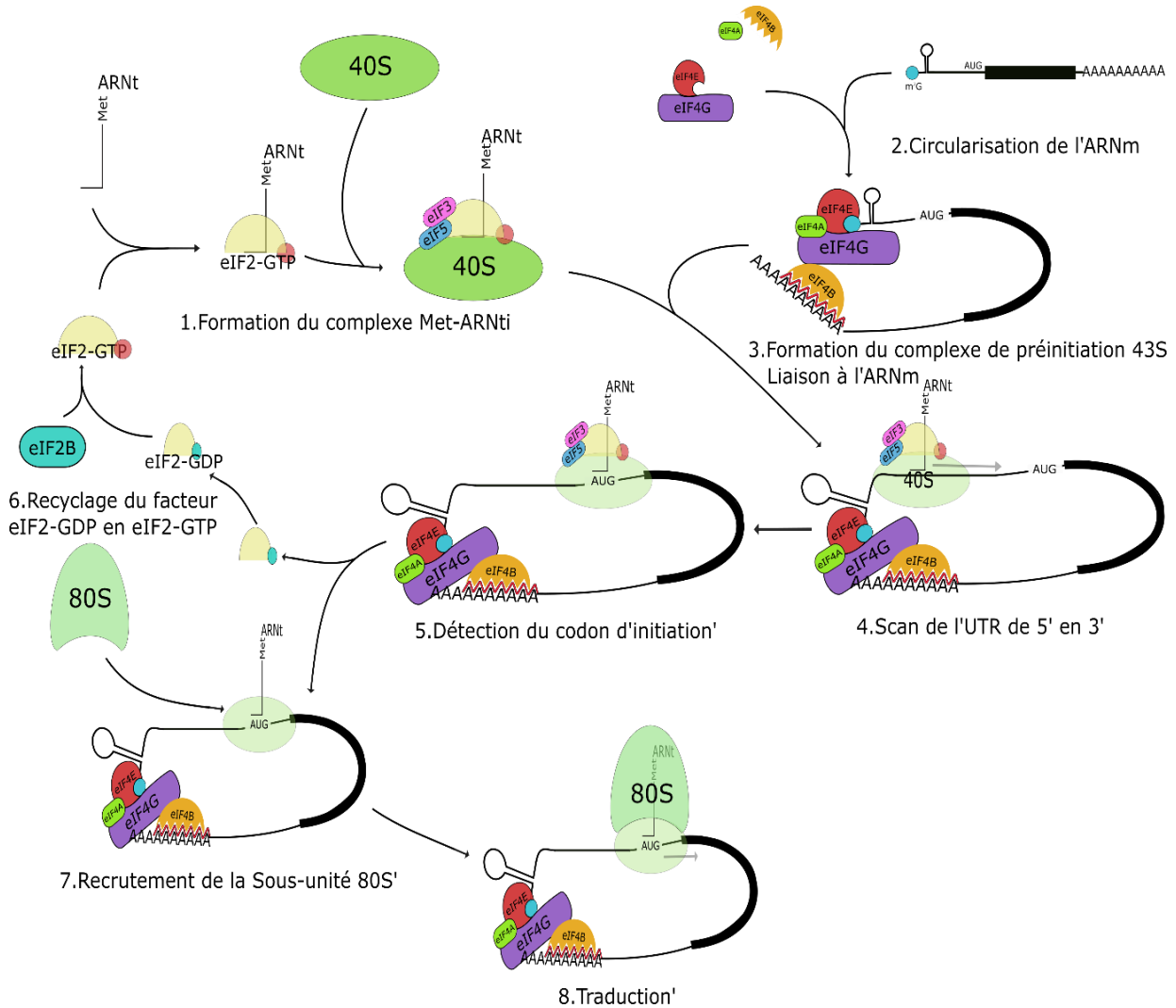


Figure 1.10: Mécanismes d'initiation de la traduction (Adaptée de Jackson *et al.*, 2010). (1) Le duplexe eIF2-GTP recrute un ARNt initiateur, puis grâce à l'intervention de eIF3 et eIF5, se lie à la sous-unité ribosomale 40S formant le complexe de préinitiation. (2) En même temps, l'ARNm est circularisé par le complexe eIF4F dont les sous unités vont lier la queue poly-A et la coiffe. (3) Le complexe de préinitiation se lie à la région 5'UTR de l'ARNm. (4) Le complexe commence le balayage de l'UTR à la recherche du codon d'initiation qui (6) entraîne la perte du eIF2-GDP qui est recyclé (7) en eIF2-GTP grâce à eIF2B. (7) La grosse sous-unité 80S est recrutée et (8) la traduction de la séquence codante est entamée.

Les facteurs d'initiation de la traduction eIF4 regroupent plusieurs protéines, toutes possédant un rôle spécifique. eIF4G et eIF4E vont former un châssis moléculaire sur lequel d'autres protéines vont pouvoir se lier afin de circulariser l'ARNm. eIF4E se lie à la coiffe en 5' du transcrit 7mGpppN (où N représente n'importe quel nucléotide) tandis que eIF4G recrute une hélicase d'ARN, eIF4A et une protéine liant l'ARN (*RNA Binding Protein*, RBP), eIF4B. eIF4A va faciliter l'aplanissement du 5'UTR (Rozen *et al.*, 1990), eIF4B va quant à lui lier la queue poly(A) (Le *et al.*, 1997). Avec l'intervention de plusieurs autres protéines liant la queue poly(A) (*Poly(A) Binding Protein*, PABP) ces facteurs vont permettre la circularisation de l'ARNm. Les cellules végétales possèdent deux isoformes d'eIF4G et eIF4E : eIFiso4G et eIFiso4E, respectivement. eIF4E et eIFiso4E possèdent jusqu'à 50% d'homologie au niveau de leur séquence d'acides aminés, alors que eIF4G et eIFiso4G n'en partagent que 35%. La différence fonctionnelle des deux isoformes est encore mal comprise. On sait qu'eIFiso4F (eIFiso4G-eIFiso4E) est plus abondant au stade embryonnaire du blé, dans les racines du maïs et dans les fleurons de chou-fleur (Kawaguchi et Bailey-Serres, 2002). On sait aussi que la traduction par eIFiso4F est dépendante de la coiffe, à l'opposé d'eIF4F (eIF4G-eIF4E) qui est plus flexible, et capable d'initier la traduction d'ARNm avec des 5'UTR complexes (structure en tige-boucle, etc.) même en l'absence d'une coiffe, comme c'est le cas pour les IRES (Gallie et Browning, 2001). Tout comme eIF2, eIF4E peut être ciblé par des protéines visant à réguler la traduction et ce, par phosphorylation ou liaison directe. Chez les mammifères, l'exemple le plus connu est celui des 4E-BP (eIF4E *Binding Protein*), ces protéines vont lier eIF4E au même motif reconnu par eIF4G, ce qui a pour effet de limiter la formation du complexe eIF4 inhibant toute traduction (Haghighat *et al.*, 1995; Marcotrigiano *et al.*, 1999). La capacité de liaison des 4E-BP à leur cible est liée à leur état de phosphorylation contrôlé par la kinase TOR (*Target Of Rapamycin*) (décrit dans Sesma *et al.*, 2017). En plus des 4E-BP, il existe plusieurs autres protéines qui interagissent avec divers motifs d'eIF4E et avec les UTR de l'ARNm à traduire. Ces liaisons protéines-protéines vont placer l'ARNm dans une conformation défavorable à la traduction (Rhoads, 2009). Les 4E-BP et autres facteurs de régulation d'eIF4E sont nombreux, et assurent une fonction essentielle pour la cellule. Malgré leur importance, aucun homologue n'a été découvert à ce jour chez les plantes. Cependant, un grand nombre de protéines arborent

la capacité de lier le motif d'eIF4E et eIFiso4E ciblé par les 4E-BP, mais leur rôle n'a jusqu'à maintenant jamais été démontré (Freire, 2005; Lázaro-Mixteco et Dinkova, 2012).

1.4.3 La régulation de la traduction

La traduction est un processus énergivore qui nécessite donc d'être régulé. Comme nous venons de le voir, l'initiation de la traduction est une des étapes clés du phénomène, et les nombreux facteurs nécessaires à son bon fonctionnement sont eux même régulés par différents composants. Il existe aussi plusieurs voies de régulation de la traduction qui agissent de manière indépendante aux facteurs d'initiation.

1.4.3.1 Les sRNA

Les sRNA (*short* RNA) sont des ARN non codants qui, lorsque sous forme de duplexe, sont pris en charge par le complexe d'ARN interférent (RISC), dans lequel ils agissent sous forme simple brin et permettent le clivage ou l'inhibition de la traduction (Reinhart *et al.*, 2002). Selon la provenance de l'ARNdb, ils sont classés différemment. Typiquement, les siRNA ou ARN interférents proviennent d'ARN exogène, d'origine virale par exemple ou endogène d'ARN antisens. Les microARN (miRNA), eux, proviennent de gènes *MIR* qui codent pour des gènes connus pour former des structures secondaires. Les siRNA, de par leur origine, enclenchent le système d'ARN interférent (RNAi) qui est un système de défense en soi. Puisque la plupart des virus produisent de l'ARNdb et enclenchent donc le RNAi, ce dernier est souvent considéré comme réponse de défense antivirale. Les miRNA sont de petits ARN non codants d'environ 22 nt. Leur rôle principal est de réguler la traduction de divers ARNm endogènes sélectionnés par complémentarité. Le gène *lin-4*, qui contrôle le passage du premier état larvaire au second chez *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993), fut le premier à avoir été identifié comme non codant pour une protéine, mais pour une paire de petits ARN (Lee *et*

al., 1993). La biosynthèse de ces petits ARN non codants commence par la transcription du gène correspondant, grâce à la Polymérase d'ARN de type II. Les pré-miRNA générés forment ensuite une tige-boucle stabilisée grâce à différentes protéines. Parmi celles-ci on compte *Dawdle* (DDL), une protéine liant l'ARN, la protéine à doigt de zinc *Serrate* (SE) et *Hyponastic leaves 1* (HYL1) (Kurihara *et al.*, 2006). Le complexe créé est reconnu par les protéines *Dicer-Like* (DCL). Le nombre de DCL retrouvés chez les plantes varie en fonction de l'espèce, le modèle *A. thaliana* en possédant 4. Les DCL sont responsables du clivage des pré-miRNA et de la formation d'un duplex de miRNAdb. DCL1 est le plus souvent impliqué dans la synthèse des miRNA. Ce dernier génère des miRNA de 21 nt, tandis que DCL4, DCL2 et DCL3 aboutissent à des produits de 21 nt, 22 nt et 24 nt, respectivement (Liu *et al.*, 2009). Toutes les étapes précédentes se produisent à l'intérieur du noyau chez les plantes. Par la suite le duplex est méthylé par *Hua Enhancer 1* (HEN1) pour permettre l'exportation hors du noyau (Kurihara *et al.*, 2006). Une fois dans le cytoplasme, les deux brins d'ARN sont dissociés, l'ARN guide est incorporé au complexe d'ARN interférent (mRISC). La protéine Argonaute (AGO) la plus souvent associée au mRISC est AGO1, mais dans certains cas AGO10 peut aussi être impliquée (Beauclair *et al.*, 2010). Le complexe est ainsi dirigé vers les ARNm à réguler, et ce, par complémentarité. Le clivage de l'ARNm est assuré par l'activité endonucléase des AGO (Miyoshi *et al.*, 2016). Les miRNA de cellules végétales s'apparient à leur cible avec une complémentarité presque parfaite (Bartel, 2009). À l'opposé, les miRNA retrouvés dans les cellules animales ne nécessitent qu'un appariement entre les nucléotides 2 à 8 en 5' du miRNA, aussi nommés « *seed region* » (Lewis *et al.*, 2003). En plus du clivage, les miRNA de cellules animales sont capables d'inhiber la traduction des ARNm. Avec une complémentarité presque parfaite, il a longtemps été supposé que le clivage était prédominant chez les plantes, or diverses études ont démontré que ce n'est pas toujours le cas. Ces recherches notent une divergence entre la faible quantité de protéines exprimées et le niveau d'ARNm correspondant qui reste inchangé. Cette observation supporte l'hypothèse des deux mécanismes de régulation par les miRNA présents chez les plantes (Beauclair *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2013). De plus, comme chez les animaux, la région 5' des miRNA de plantes est aussi importante. Mallory *et al.* (2004) ont montré que la mutation de nucléotides dans cette même

région chez miR165/166 diminue drastiquement le taux de clivage de leur cibles *PHABULOSA* et *PHAVOLUTA*, comparé à un mésappariement dans une région plus centrale. Chez *A. thaliana*, où les miRNA sont amplement étudiés, miR156 possède un rôle important dans les transitions entre les différentes étapes du développement de la plante (Yu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009) et agit en synergie avec miR172 (Wu *et al.*, 2009). L'ARN miR398 est quant à lui impliqué dans la tolérance au stress oxydatif (Wang *et al.* 2009; Sunkar *et al.*, 2006), etc. Ces nombreuses études démontrent l'importance des miRNA dans la régulation de la traduction.

1.4.3.2 uORF

En plus des sites de liaison aux microARN, les UTR peuvent aussi comporter d'autres sites de régulation de la traduction. En effet, il est possible de retrouver des petites régions codantes en amont de la séquence codante principale ou ORF (*Open Reading Frame*). Ces petites régions sont composées d'un codon d'initiation et sont nommées uORF (*upstream Open Reading Frame*). En règle générale, si le codon d'initiation détecté est celui d'un uORF, la traduction de l'ORF principal qui s'en suit se verra diminuée (Kozak, 1987), mais jamais complètement inhibée (Damiani *et al.*, 1993). L'effet des uORF sur la traduction a tout d'abord été démontré chez le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). La région 5'UTR de CaMV contient 6 uORF et une tige boucle qui suit le premier uORF. Les ribosomes ayant traduit le premier uORF est capable de passer à travers la structure en tige boucle en aval, sans avoir à la déplier. Ce processus permet d'assurer qu'une certaine région de l'UTR reste à l'abri des ribosomes. Dans ce cas précis, la séquence en tige boucle comprend un signal d'encapsulation d'ARN (Guerra-Peraza *et al.*, 2000). Ce mécanisme est communément appelé *shunting*. L'acquisition d'uORF semble adaptative et grandement influencée par le rôle de la protéine encodée en aval. Les protéines fortement exprimées ont tendance à disposer d'un UTR en amont assez court, tandis que les protéines faiblement exprimées comme les facteurs de transcription ou les kinases, elles, possèdent souvent un 5'UTR long avec un ou plusieurs uORF (Kim *et al.*, 2007). Même si plusieurs aspects de ces uORF sont encore mal compris, leur importance n'est plus à démontrer. En effet, jusqu'à 35% des gènes d'*A. thaliana* produisent des ARNm qui

contiennent des uORF (Kim *et al.*, 2007). Une faible fraction des uORF retrouvés dans n'importe quel organisme code pour un peptide dont la séquence est conservée. Cette séquence conservée semble être d'une grande importance quant à la répression de la traduction (Jorgensen et Dorantes-Acosta, 2012; Takahashi *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2008). Cependant, les preuves d'accumulation de ces peptides aussi bien dans les cellules animales que dans les cellules végétales sont encore peu nombreuses. Le groupe de Slavoff *et al.* (2013) a tout de même identifié jusqu'à 150 peptides d'uORF dans le cytoplasme de cellules humaines. Deux hypothèses ont été émises sur le mécanisme d'action de ces peptides (1) le peptide tout juste généré suite à la traduction de l'uORF viendrait se caler dans le tunnel de sortie du ribosome, empêchant ainsi ce dernier de poursuivre le balayage (Rahmani *et al.*, 2009). (2) Le peptide jouerait une fonction qui lui est propre, et, en se liant à l'ARNm, déstabiliserait ce dernier (Chang *et al.*, 2000; Combier *et al.*, 2008). Comme mentionné plus tôt, seulement une faible partie des uORF codent pour des peptides à séquence conservée. Les uORF ne faisant pas partie de cette catégorie ont quand même un impact sur l'efficacité de traduction de l'ORF en aval. La détection du codon d'initiation d'un uORF empêche la réinitiation à l'ORF principal. Les ribosomes emploient donc diverses tactiques pour permettre la traduction de l'ORF principal. Les ribosomes peuvent ignorer le codon d'initiation de l'uORF (uAUG), un processus appelé *leaky scanning*, ou encore par *shunting* qui est un processus jusqu'à maintenant assez propre aux virus. Une autre méthode serait la réinitiation. Cette dernière est rendue possible lorsque l'étape de terminaison lors de la traduction d'un uORF est interrompue avant que la sous unité 40S n'ait le temps de se détacher de l'ARNm. Le ribosome acquiert ensuite un nouvel ARNt initiateur et tous les autres facteurs d'initiation nécessaires pour poursuivre le scan de l'UTR (Kozak, 2002). Ce phénomène est rendu possible car les facteurs d'initiation (eIF) restent attachés à la sous unité 80S, la rendant compétente pour la réinitiation (Mohammad *et al.*, 2017). Il a été suggéré que eIF3h agirait en tant que facteur de rétention des facteurs de réinitiation au ribosome 80S (Schepetilnikov *et al.*, 2013, Park *et al.*, 2001). Les uORF sont connus pour réguler différents métabolismes dont celui des polyamines chez les plantes (Hanfrey *et al.*, 2005), des glucides et du sucrose (Hayden et Jorgensen, 2007) ou

encore la réponse à l'auxine (Zhou *et al.*, 2010) et représentent une partie non négligable des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

1.4.3.3 La voie TOR

Une des voies clés de régulation de la traduction est celle impliquant la kinase *Target Of Rapamycin* (TOR). Cette voie est responsable de la gestion des ressources, c'est-à-dire qu'elle permet, à travers la régulation de la traduction, d'orienter la cellule vers l'anabolisme ou le catabolisme en réponse à divers stimuli. De plus, elle est sensible à plusieurs facteurs exogènes tels que la carence en nutriments (Dobrenel *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2011), ou l'infection par un agent pathogène (Meteignier *et al.*, 2017), etc. Chez les mammifères, mTOR interagit avec beaucoup de protéines de régulation pour former deux complexes distincts : TOR complexe 1 (TORC1) et TOR complexe 2 (TORC2). TOR contrôle la phosphorylation de la kinase ribosomale S6 (S6K), qui par la suite phosphoryle la RPS6, une protéine du ribosome 40S, ce qui stimule *in fine* la traduction (Holz *et al.*, 2005). La seconde voie connue de régulation par TOR est la phosphorylation des 4E-BP. Comme mentionné plus tôt, les 4E-BP vont lier eIF4E au site de liaison d'eIF4G, inhibant alors la formation du complexe eIF4F, et l'initiation de la traduction. Après phosphorylation par TOR, les 4E-BP se dissocient d'eIF4E, alors que dans un état non phosphorylé, les 4E-BP se lient à leur cible de manière très stable (Pause *et al.*, 1994). Chez la levure, la rapamycine inhibe l'activité de TOR, mais nécessite l'intervention de ScFKBP12 (*FK506 binding protein 12*) qui forme une plateforme de liaison entre les deux protéines (Stan *et al.*, 1994). Chez les végétaux, FKBP12 a perdu sa capacité à lier la rapamycine et seul TORC1 y est retrouvé. Il comprend une protéine conservée nommée RAPTOR (*Regulatory- associated protein of TOR*) ainsi que LST8 (*Lethal with Sec 13*) (Dobrenel *et al.*, 2016). L'implication de la voie TOR dans la régulation de la traduction chez les plantes a déjà été établie, l'inactivation de TOR par des inhibiteurs ou son extinction génique diminue l'abondance du polysome (Deprost *et al.*, 2007; Sormani *et al.*, 2007). Le traitement de plants d'*A. thaliana* exprimant le transcrit ScFKBP12 (de *Saccharomyces cerevisiae*), à la rapamycine diminue l'activité d'AtTOR ce qui suggère que la fonction de

régulation de la voie TOR est conservée entre les espèces. AtS6K par exemple, possède le même motif ciblé par la phosphorylation que celui retrouvé dans les cellules animales (Turck *et al.*, 1998; Turck *et al.*, 2004). De plus, il est capable de phosphoryler RPS6 lorsqu'il interagit avec RAPTOR (Mahfouz *et al.*, 2006). On sait aussi que chez les mammifères S6K assure une fonction dans la ré-initiation de la traduction après un uORF (*upstream ORF*), à travers la phosphorylation du facteur d'élongation eIF3h qui permettrait le maintien des facteurs de réinitiation au ribosome 80S et entrainerait la poursuite du scan de la région UTR (Schepetilnikov *et al.*, 2013). De plus, le mutant d'*A. thaliana eIF3h* présente une diminution drastique du niveau de traduction des ARNm avec uORF (Zhou *et al.*, 2010). Il a été proposé que TOR agirait dans le polysome pour maintenir S6K actif et donc eIF3h dont le statut de phosphorylation est nécessaire au mécanisme de réinitiation (Schepetilnikov *et al.*, 2013). Cependant, les cibles majeures de phosphorylation par TOR chez les animaux, les 4E-BP, n'ont pour l'instant aucun équivalent chez les plantes. Même si l'importance de cette voie chez les plantes a déjà été démontrée, les événements moléculaires en amont et en aval de TOR sont encore à déterminer.

1.5. Traductome de défense d'*A. thaliana*

La transcription a jusque maintenant fait l'objet de très nombreuses études, mais peu d'équipes se sont encore intéressées aux autres niveaux de régulation d'expression génique. Malgré le nombre élevé de cibles de régulation post-transcriptionnelle qui témoigne de l'importance de ce processus, très peu d'études se sont penchées sur l'analyse du traductome en condition de défense. Or on sait que l'infection d'*A. thaliana* avec une bactérie avirulente, induit dans un premier temps des changements au niveau du protéome, suivis de changements notables du transcriptome (Jones *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2006). Cette observation suggère que l'activation de la réponse de défense de type NB-LRR fait l'objet d'une régulation traductionnelle. Il est plus courant de retrouver des données sur le traductome de la plante modèle en condition de stress abiotique. Juntawong *et al.* (2014) et Mustroph *et al.* (2009b) ont caractérisé le profil de traduction d'*A. thaliana* en hypoxie selon deux méthodes. Mustroph *et al.* (2009b) ont

démontré que l'hypoxie inhibe la traduction de 70% de transcrits cytosoliques, en utilisant la lignée transgénique d'*A. thaliana* FLAG-RPL18. Cette lignée exprime la protéine ribosomale rpl18 marquée avec une étiquette FLAG qui va permettre d'isoler les ribosomes et les ARNm en cours de traduction. Par la suite, Juntawong *et al.* (2014) ont démontré par profilage ribosomique, que l'initiation est l'étape ciblée lors de l'inhibition de la traduction induite par le manque d'oxygène. Parmi le peu d'équipes à s'être intéressées au traductome de défense d'*A. thaliana*, on compte notamment Moeller *et al.* (2012). Ces derniers ont comparé les ARNm présents dans le polysome avec l'ARNm total lors d'une interaction avec le virus de la mosaïque du Navet (TuMV). De nombreux gènes régulés au niveau de la traduction ont ainsi été identifiés, ce qui prouve alors que la régulation de ce processus semble impliquée dans la réponse au stress biotique des végétaux. Cependant, le virus utilisé dans ce pathosystème n'induit pas la ETI, l'identification de gènes régulés au niveau traductionnel après activation d'une protéine R est donc une voie non explorée. Plus récemment, il a été observé que suite à l'induction de la PTI par le PAMP elf18, la traduction est fortement régulée (Xu *et al.*, 2017). Cette étude identifie jusqu'à 523 gènes induits au niveau de la traduction contre 43 gènes réprimés au niveau de la traduction grâce à des analyses d'empreintes ribosomiques après traitement à elf18. Parmi ces gènes, on y retrouve presque tous les composants ou des homologues de la voie induite par les PAMP associée à l'éthylène et aux voies de signalisation de la PTI. Ceci démontre que la régulation de la traduction est un mécanisme important dans la réponse de défense basale chez *A. thaliana*. Malgré tout, le traductome d'*A. thaliana* suivant l'activation d'une protéine NB-LRR, n'avait encore jamais été étudié. Pourtant en, Meteignier *et al.*, (2016) ont observé lors d'une infection au virus X de la pomme de terre (PVX), une diminution du niveau de traduction des transcrits viraux et ce, après activation de la protéine NB-LRR, N. L'induction d'une réponse de défense de type NB-LRR réprimerait donc la traduction d'ARNm viraux. Cette étude suggère donc que la réponse de défense de type NB-LRR pourrait aussi entraîner une reprogrammation traductionnelle d'ARNm endogène.

1.6 Projet de Maîtrise

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de défense des plantes et la régulation qu'ils subissent, Meteignier *et al.* (2017) ont étudié le traductome d'*A. thaliana* après activation de la protéine NB-LRR, RPM1. Pour cela, les auteurs ont réalisé un croisement entre deux lignées transgéniques; *A. thaliana* FLAG-RPL18 qui comme mentionné plus tôt permet d'isoler les ARNm liés aux ribosomes, donc en pleine traduction, et une lignée d'*A. thaliana* codant pour l'Avr AvrRpm1 sous un promoteur inductible à la dexaméthasone (DEX). La lignée obtenue permet alors d'isoler les ARNm en traduction après induction d'une réponse de type NB-LRR.

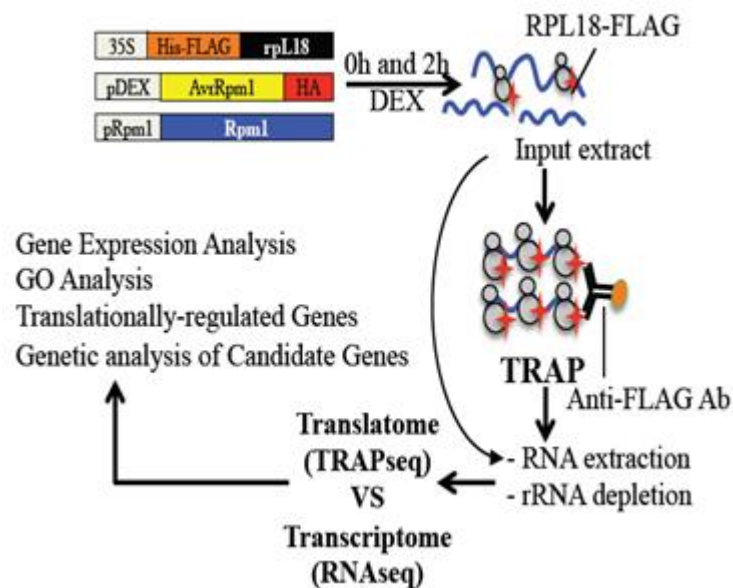


Figure 1.11: Concept expérimental pour l'étude du traductome de défense de type NB-LRR (Tirée de Meteignier *et al.*, 2017). La lignée transgénique d'*A. thaliana* utilisée ici permet l'expression de l'Avr AvrRpm1, sous un promoteur inductible au DEX. Elle exprime aussi une protéine ribosomale rpl18 marquée avec une étiquette FLAG. 0h et 2h après traitement au DEX, les ARNm totaux sont isolés en même temps. Les ARNm liés aux ribosomes sont aussi isolés grâce à un anticorps anti-FLAG. Ces derniers sont convertis en ADNc et vont former les deux bibliothèques de TRAPseq pour les ARNm liés aux ribosomes, et de RNAseq pour les ARNm totaux.

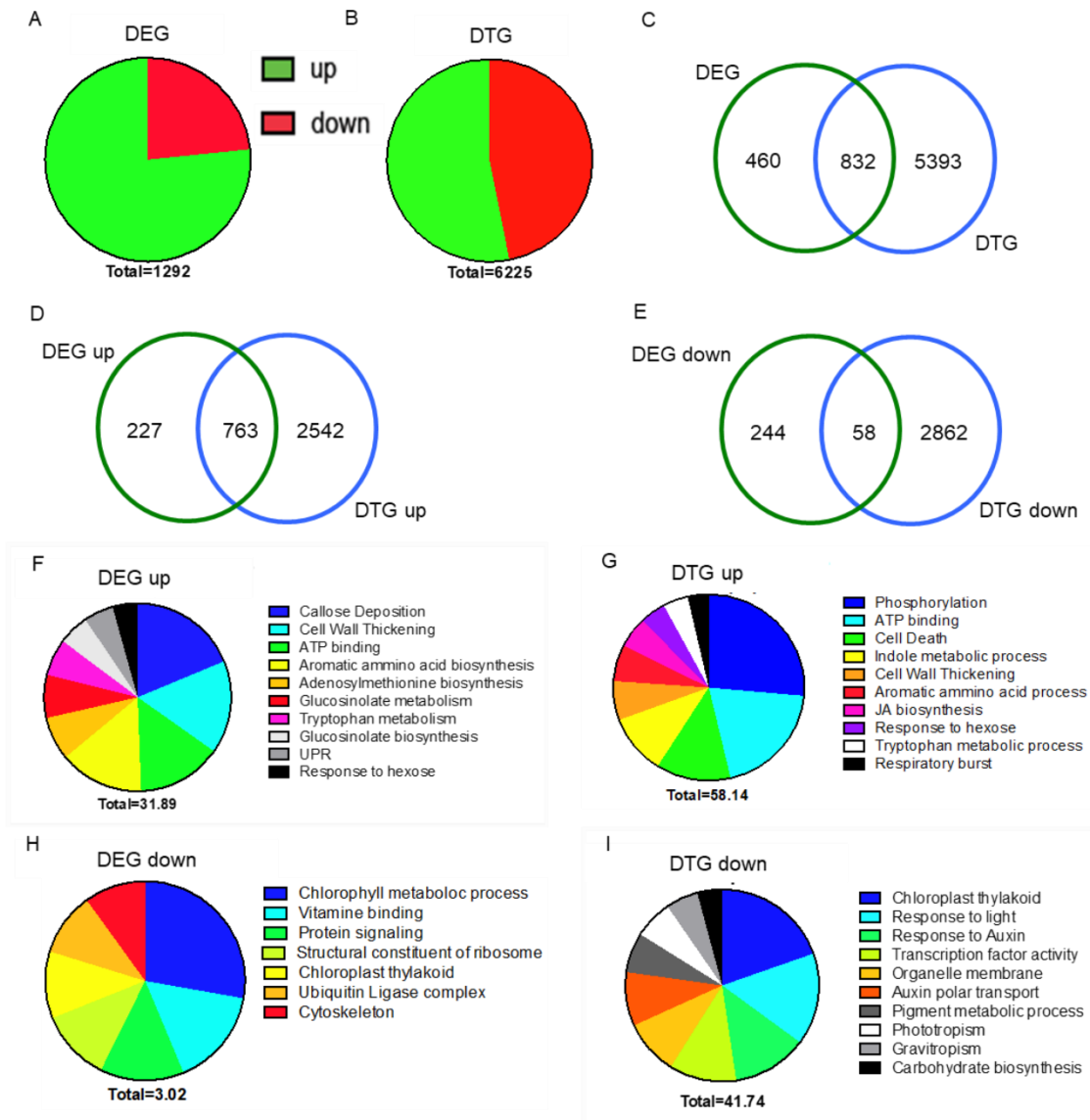


Figure 1.12: Analyse du transcriptome et traductome de défense d'*A. thaliana* (Tirée de Meteignier *et al.*, 2017). (A) Nombre de gènes différentiellement exprimés à la hausse (en vert) et à la baisse (en rouge). (B) Nombre de gènes différentiellement traduits à la hausse (en vert) et à la baisse (en rouge). (C, D, E) Représentation du chevauchement des gènes présents dans les différents sets sous forme de diagramme de Venn. (F, G, H, I) Représentation en camembert des 10 premiers gènes identifiés suite à l'analyse d'ontologie génique.

Ces ARNm sont par la suite convertis en complémentaire (ADNc) et séquencés, les résultats obtenus constitueront la librairie TRAPseq (Figure 1.11). En contrepartie, les ARNm totaux

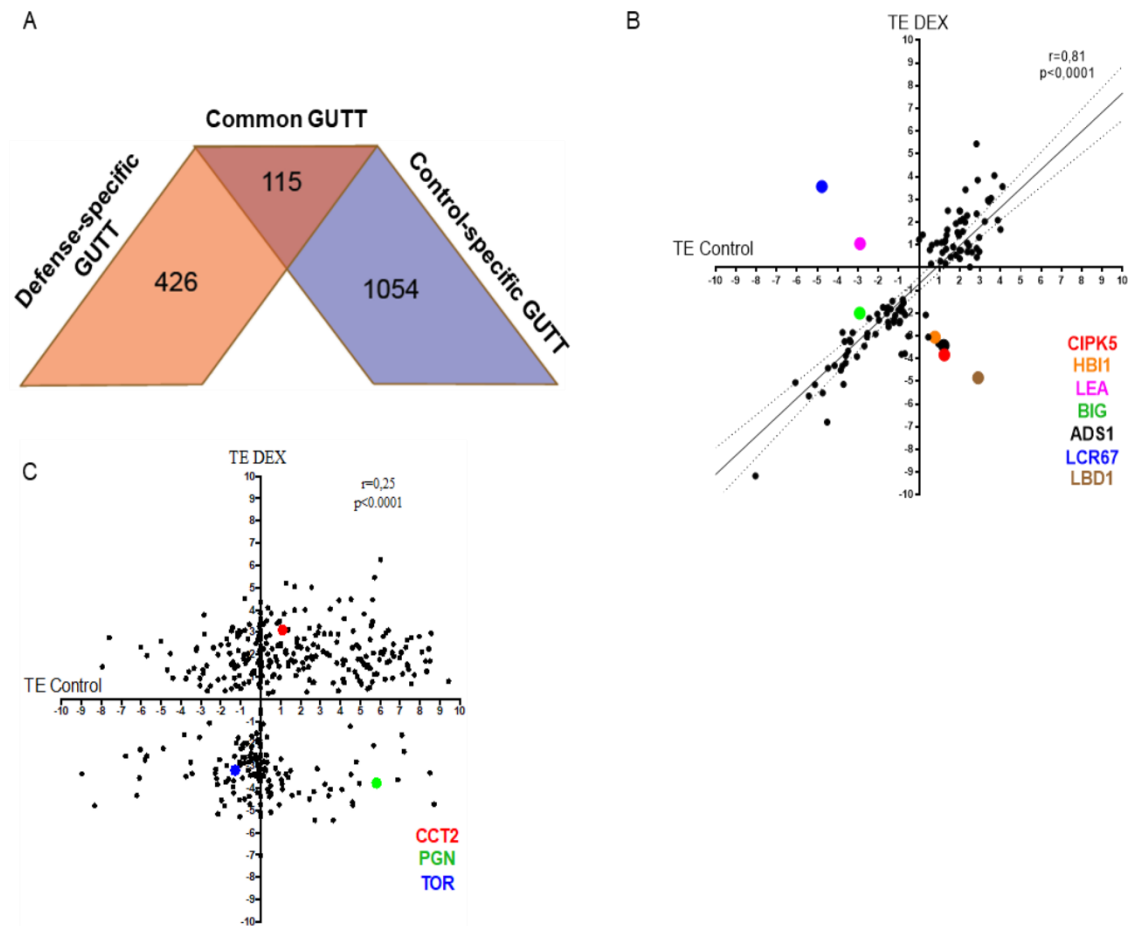


Figure 1.13: Identification des gènes contrôlés spécifiquement au niveau de la traduction lors de la réponse NB-LRR (Tirée de Meteignier *et al.* 2017). (A) Diagramme de Venn asymétrique représentant les gènes avec une traduction découplée de leur transcription et ce, en condition contrôle (Control-specific GUTT) ou défense (Defense-specific GUTT), ou les deux (Common GUTT). (B) Diagramme de dispersion de l'efficacité de traduction en condition contrôle versus en condition de défense avec le set Common GUTT. (C) Diagramme de dispersion de l'efficacité de traduction en condition contrôle versus en condition de défense avec le set Defense-specific GUTT.

sont aussi isolés et séquencés et constitueront la librairie RNAseq. 1292 gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été détectés en comparant les données de RNAseq en condition témoin, et de défense, tandis que 6625 gènes différentiellement traduits (DTG) ont été détectés en comparant les données de TRAPseq en condition contrôle, et de défense (Figure 1.12). L'analyse d'ontologie génique (OG term) montre que les gènes induits dans les deux

sets DEGup et DTG up font en général partie d'un processus de défense, du métabolisme secondaire, etc. On note par contre que le chevauchement des gènes réprimés DEGdown et DTGdown est plus mince que celui observé pour les gènes induits DEGup et DTGup. Les gènes traductionnellement réprimés font en grande majorité partie du métabolisme primaire, du métabolisme des carbohydrates, du développement, etc (Figure 1.12). Par la suite l'efficacité de traduction (TE) des ARNm est déterminée par le Log2 du ratio de la valeur en FPKM du TRAPseq sur la valeur en FPKM du RNAseq, dans le but d'identifier des gènes exhibant une efficacité de traduction découplée de leur transcription (GUTT). Une partie des GUTT mis en lumière arborent une TE positive ou négative similaire dans les deux conditions. Cependant, de nombreux gènes possèdent une TE significativement différente après traitement au DEX. Ainsi tous les GUTT ont été classés en trois groupes. Le « common GUTT » comprend les gènes avec une TE positive ou négative en condition contrôle et inversement en condition de défense. Le « control-specific GUTT » comprend les gènes avec une TE qui varie spécifiquement en condition contrôle. Enfin le « defense-specific GUTT » comprend les gènes avec une TE qui varie spécifiquement en condition de défense (Figure 1.13).

Tableau 1: Gènes testés ou mentionnés dans cette étude et le TE qui leur correspond (Tiré de Meteignier *et al.* 2017).

TAIR ID	Gene name	TE DEX	TE Control	TRAP-seq (DTG)	RNA-seq (DEG)
AT2G18300	<i>HBI1</i>	-3.05 (0.12)	0.77 (1.70)	-5.26 (0.02)	ns
AT3G02260	<i>BIG</i>	-1.99 (0.25)	-2.92 (0.13)	1.07 (2.10)	ns
AT4G15130	<i>CCT2</i>	3.10 (8.57)	ns	3.01 (8.05)	ns
AT1G50030	<i>TOR</i>	-3.19 (0.11)	ns	ns	ns
AT5G10930	<i>CIPK5</i>	-3.83 (0.07)	1.23 (2.34)	-4.38 (0.05)	ns
AT3G09070	<i>OPS</i>	+inf	ns	1.44 (2.71)	-inf
AT1G60000	Unknown	-4.37 (0.05)	ns	-3.6 (0.08)	ns
AT3G23900	Unknown	-2.84 (0.14)	ns	-1.1 (0.46)	ns
AT4G21020	<i>LEA</i>	+inf	-inf	+inf	-inf
AT1G56570	<i>PGN</i>	-inf	ns	-inf	ns
AT4G34410	<i>RRTF1</i>	1.73 (3.32)	ns	7.78 (219.80)	ns
AT1G07280	Unknown	-4.49 (0.04)	ns	-4.45 (0.04)	ns
AT1G07900	<i>LBD1</i>	-inf	+inf	-inf	+inf
AT5G14740	<i>CA2</i>	-2.35 (0.20)	-0.94 (0.52)	-2.19 (0.22)	ns
AT3G16640	<i>TCTP</i>	ns	-1.43 (0.37)	0.84 (1.79)	ns
AT4G36990	<i>TBF1</i>	ns	ns	4.95 (30.91)	5.79 (55.33)
AT1G75830	<i>LCR67</i>	+inf	-inf	+inf	ns

TE, $\text{Log}_2(\text{FPKM}_{\text{TRAP}}/\text{FPKM}_{\text{RNA}})$; (x), absolute fold-change ($\text{FPKM}_{\text{TRAP}}/\text{FPKM}_{\text{RNA}}$); ns, not significant; +inf, denominator is not detected; -inf, numerator is not detected.

C'est ainsi qu'une liste de gènes candidats a été dressée, les gènes en question possédant une TE qui varie (du positif au négatif ou inversement) spécifiquement après induction d'une réponse de défense de type NB-LRR (Tableau 1). Des gènes tels que *CIPK5* (*CBL-Interacting Protein Kinase 5*) et *HBII* (*Homolog of Bee2 Interacting with IHB1*) présentent respectivement une TE normale en condition contrôle et une TE négative en condition de défense. À l'opposé, *LCR67* (*Low-molecular-weight Cysteine-Rich 67*) et *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*) ont une TE négative en condition normale et positive en condition de défense. Tous ces candidats font donc partie du groupe « *common GUTT* ». D'autres candidats intéressants font partie du groupe « *defense-specific GUTT* » tels que *TOR* (*Target Of Rapamycin*) et *PGN* (*Pentatricopeptide repeat protein for Germination on NaCl*), lesquels arborent une TE normale en condition contrôle, mais négative en condition de défense, contrairement à *CCT2* (*Phosphorylcholine Cytidylyltransferase 2*) qui lui, possède une TE normale en condition contrôle, et positive en condition de défense. Il est surprenant de réaliser que très peu de ces gènes n'aient été liés à quelque processus de défense jusqu'à maintenant, à part *PGN* qui est impliqué dans la résistance à un champignon nécrotrophe en plus de la résistance abiotique (Laluk *et al.*, 2011). Maintenant qu'il est établi que la reprogrammation traductionnelle est une des causes de l'activation de la protéine NB-LRR RPM1, de nombreuses questions sont à aborder.

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer si les gènes candidats identifiés et qui subissent donc une régulation post-transcriptionnelle, ont un rôle dans la réponse de défense des plantes. Pour cela, des lignées mutantes T-DNA pour certains de ces gènes candidats vont être exposées à des infections par différents agents pathogènes. Il sera ainsi possible de définir si ces gènes régulés au niveau de la traduction sont nécessaires à l'établissement d'une réponse de défense, et ce, à différents niveaux (PTI, ETI et antivirale), et donc d'identifier de nouveaux acteurs de la résistance végétale.

On sait que de la traduction de nombreux transcrits est régulée assez spécifiquement après l'activation d'une protéine NB-LRR. Dans un second temps, il serait intéressant d'identifier le ou les mécanismes responsables de cette régulation. En effet, comme nous l'avons vu plus tôt la traduction est un processus très régulé et les ARNm sont ciblés par de nombreux mécanismes de régulation. Les régions transcrites, mais non traduites (UTR) sont particulièrement connues pour être visées par des protéines, ARN non codants, et autres composés permettant l'activation ou l'inhibition de la traduction du transcrit. Le plan d'étude ici vise à cloner des UTR 5' et 3' de gènes candidats dans une construction en amont ou en aval d'un gène rapporteur afin d'évaluer l'effet de ces régions dans la traduction du transcrit qui leur correspond.

Toute l'analyse du traductome de défense se basant sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le troisième volet de ce projet vise à examiner la présence d'une même régulation traductionnelle lors d'une réponse de défense de type NB-LRR, mais chez une autre plante modèle : *Nicotiana benthamiana*. Pour cela, le plant transgénique *N. benthamiana* p50/L18 sera induit en condition de défense, puis sous le même principe que l'analyse du traductome d'*A. thaliana*, l'ARNm total et lié au ribosome sera extrait. L'expression d'homologues de certains gènes candidats identifiés chez *A. thaliana* sera évaluée chez le modèle des solanacées par analyse qPCR. Ces analyses permettront d'affirmer ou d'infirmer que la régulation de la traduction des gènes candidats identifiés dans l'étude de Meteignier *et al.* (2017) est un processus conservé à travers les espèces.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Conditions de croissance du support végétal

2.1.1 Arabidopsis thaliana

Les lignées mutantes homozygotes d'*Arabidopsis thaliana* ayant le fond génétique de l'écotype Col-0, ont été obtenues du Arabidopsis Ressource Centre à l'Université d'Ohio, USA (Alonso *et al.*, 2003). Les graines sont semées en sol (Agro-mix, Fafard, QC, CANADA) puis placées à 4°C dans le noir pendant 2 jours pour stratification. Chaque pot est placé en chambre de croissance sous un cycle de 12 h de jour / 12 h de nuit, 60 % d'humidité, à 22°C.

2.1.2 Nicotiana benthamiana

La lignée transgénique de *Nicotiana benthamiana* pTA50 est capable d'exprimer un fragment de la réplicase de TMV, p50, sous un promoteur inductible à la dexaméthasone (DEX). De plus, elle possède aussi le transgène *N* de *Nicotiana glutinosa* (Meteignier *et al.*, 2016). La lignée p50/L18 peut en plus produire la protéine ribosomale rpl18 portant une étiquette FLAG sous le même promoteur constitutif 35S. Ces deux transgéniques ainsi que *N. benthamiana* de type sauvage (WT) ont été semées en sol (BM6, Berger, Saint- Modeste, Qc) puis placées en chambre de croissance sous un cycle de 16 h de jour / 8 h de nuit, 60 % d'humidité et 22°C.

Tableau 2.1 Liste des lignées transgéniques d'*A. thaliana* testées lors des différentes infections

Nom du mutant	Numéro d'identification TAIR	Numéro d'accension	Références
<i>big</i>	AT3G02260	SALK_1054950C	(Alonso, 2003)
<i>cipk5-1</i>	AT5G10930	SALK_084455C	(Alonso, 2003)
<i>cipk5-2</i>	AT5G10930	SALK_063555C	(Alonso, 2003)
<i>cct2</i>	AT4G15130	SALK_200207C	(Alonso, 2003)
	AT3G23900	SALK_015201C	(Alonso, 2003)
<i>ops</i>	AT3G09070	SALK_089722C	(Alonso, 2003)
<i>tpr</i>	AT1G07280	SALK_022732C	(Alonso, 2003)
<i>lea</i>	AT4G21020	SALK_151565C	(Alonso, 2003)
<i>pgn</i>	AT1G56570	SALK_141937	(Alonso, 2003)
<i>rrtf1</i>	AT4G34410	SALK_150614	(Alonso, 2003)
<i>doc1-1</i>	AT3G02260	CS6204	(Li, Altschmied, & Chory, 1994)
<i>35S:PGN;pgn</i>	AT1G56570		(Laluk, Abuqamar, & Mengiste, 2011)
<i>tzf1A-1</i>	AT2G25900	SALK_112158C	(Alonso, 2003)
<i>tzf1A-2</i>	AT2G25900	SALK_143721C	(Alonso, 2003)
<i>tctp1</i>	AT3G16640	SALK_000005C	(Alonso, 2003)
<i>tctp2</i>	AT3G16640	SALK_075970C	(Alonso, 2003)
<i>ops-A</i>	AT3G09070	SALK_089722C	(Alonso, 2003)
<i>ops-B</i>	AT3G09070	SALK_042563C	(Alonso, 2003)
	AT1G60000	SALK_203629C	(Alonso, 2003)
TOR RNAi	AT1G50030		(Deprost <i>et al.</i> , 2007)
TOR OE	AT1G50030		(Deprost <i>et al.</i> , 2007)

2.2 Conditions de croissance des souches bactériennes

Pour toutes les expériences de clonages, des cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH5α ont été utilisées. Ces cellules sont cultivées dans un milieu LB (*lysogeny broth*) avec 50 µg/mL de kanamycine à 37°C pour 24 h. Toutes les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 [qui portent le plasmide pEAQ-SE-F_luc ou pEAQ-SE-R_luc (Ali *et al.*, 2015)] ont été transformées par électroporation. Les souches de *Pseudomonas syringae* DC3000 *pv* *tomato* (*Pto* DC3000) AvrRpm1, AvrRpt2 et eV ont été obtenues du laboratoire du professeur Darrell Desveaux (University of Toronto, ON, CANADA). Les bactéries sont inoculées sur milieu LBA (*lysogeny broth* agar) et incubées à 28°C pendant 48 h. Le milieu est supplémenté avec 5 µg/mL de tétracycline et 50 µg/mL de kanamycine pour *Agrobacterium tumefaciens*, 50 µg/mL de kanamycine et 50 µg/mL de rifampicine pour *Pto* DC3000.

2.3 Test de résistance aux agents pathogènes

2.3.1 Infection à *Pseudomonas syringae* DC3000

Les infections sont effectuées selon le protocole décrit par Katagiri *et al.*, (2002). Les cellules bactériennes sont incubées 18 h avec agitation à 28°C et 200 RPM en milieu LB liquide. Après centrifugation à 4000 RPM pendant 10 minutes, elles sont re-suspendues dans 5 mL de MgCl₂ 10 mM stérile afin de déterminer la densité optique des cultures. Les différentes lignées d'*A. thaliana* âgées de 5 semaines sont infectées par infiltration sous vide avec une solution de MgCl₂ 10 mM, 0,004% de Silwet L-77 et une DO₆₀₀ bactérienne finale de 0,002. Le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) présentes à l'intérieur de la plante est dénombré 3 jours post infection. La densité bactérienne est évaluée à partir de trois disques de feuille d'environ 0,5 cm² préalablement rincée à l'éthanol 70% puis à l'eau distillée stérile. Les disques sont ensuite broyés dans du MgCl₂ 10 mM stérile puis dilués. Les solutions diluées sont inoculées sur milieu LBA (voir section 2.2), puis le nombre d'UFC est dénombré à la dilution appropriée et normalisé avec la surface foliaire en cm². Les résultats sont convertis au format logarithmique et comportent tous au minimum 3 réplicats (n=9). Les analyses statistiques sont effectuées par une ANOVA à composante multiple ***P<0,001, où chaque génotype est comparé au type sauvage Columbia-0 (Col-0).

2.3.2 Infection à *Hyaloperonospora arabidopsidis*

Différents génotypes d'*A. thaliana* sont infectés avec un inoculum d'*Hyaloperonospora arabidopsidis* (*H. a.*) selon le protocole de Asai, Shirasu, et Jones, 2015. Brièvement, une solution d'H₂O et de spores est préparée à une concentration variant de 2 x 10⁵ à 4 x 10⁵ spores/mL. Après propagation par spray, les plants sont placés en chambre de croissance à 18°C et 70% d'humidité pendant 10 à 12 jours selon la sévérité des symptômes. Après

incubation le nombre de spores par masse fraîche (spores/MF), est déterminé pour chaque lignée, certains plants sont soumis à une coloration au bleu de trypan. La première étape de coloration consiste à infiltrer les feuilles avec une solution de phénol (non saturée), acide lactique, glycérol et bleu de trypan 1 mg/mL. La coloration est fixée à la chaleur, puis les échantillons sont trempés dans de l'hydrate de chloral 2,5 g/mL pour décoloration. Les feuilles sont ensuite prises en photo grâce au *Zeiss Observer.Z1* (Université de Sherbrooke) et au *LEICA MZ 16 F* (University of Toronto). Les statistiques appliquées au dénombrement de spores sont effectuées par ANOVA à composante multiple ***P<0,001, chaque génotype est comparé au type sauvage Col-0.

2.3.3 Infection à *Plantago asiatica mosaic virus*

Des plants d'*A. thaliana* âgés de 3 à 5 semaines sont inoculés avec un mélange de sève infecté selon un protocole déjà établi par Brosseau, El Oirdi, Adurogbangba, Ma, et Moffett, 2016. L'inoculum est préparé à partir de feuilles de *N. benthamiana* infectées avec *PLAMV* AvrRpm1 ou *PLAMV* AvrRpt2 ou *PLAMV*-GFP broyées dans une solution de phosphate 0.1 M à pH 7 (2 mL/g de tissu infecté). À partir de cet inoculum, les plantes d'*A. thaliana* sont infectées par friction, puis récoltées après 7 à 16 jours post-infection. Les échantillons sont soumis à un immunobuvardage de type western (voir section 2.6.2) afin d'observer la présence ou l'absence du virus.

2.4 Clonage

Les UTR en amont et en aval des gènes *CIPK5*, *TOR*, *LCR67*, *HB11* et *LEA* d'*A. thaliana* utilisés pour les essais d'expression de luciférase sont entièrement synthétisées sous forme de blocks d'ADN, gBlocks® Gene Fragments (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) (Tableau 2.2). Chaque fragment est amplifié grâce à des amorces spécifiques (Tableau 2.3), la KOD Hot Start Polymerase (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) est employée pour le

Les produits d'amplification sont migrés sur gel d'agarose 2 % pour s'assurer de la spécificité des amorces, puis subissent une extraction au phénol-chloroforme (section 2.5). Tous les UTR sont clonés dans le vecteur pEAQ-SE-F_Luc un dérivé du vecteur pEAQ-SE35S (Ali *et al.*, 2015) lui-même dérivé du vecteur of pEAQSelectK (Sainsbury *et al.*, 2009). pEAQ-SE-F_Luc comporte la séquence codante pour la *luciférase* firefly et la cassette 35S (promoteur et terminateur) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), qui a été générée préalablement par Chantal Brosseau. Le plasmide est linéarisé avec les enzymes de restriction *Hind*III-HF et *Bam*HI (NewEngland Biolabs, ON, CANADA), de même que les amplicons produits à partir du gBlock-5'UTR afin de générer des extrémités cohésives. Le vecteur et les inserts digérés sont migrés sur gel d'agarose 1 % pour vérifier l'efficacité de la digestion, puis purifiés par extraction au phénol-chloroforme (section 2.5). La ligation des inserts dans pEAQ-SE-F_Luc se fait avec la T4 DNA Ligase (New England Biolabs, ON, CANADA) et son tampon T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs, ON, CANADA). Pour le clonage des 3'UTR, le plasmide pEAQ-SE-F_Luc est linéarisé avec *Sac*I-HF (New England Biolabs, ON, CANADA), migré sur gel d'agarose 1 % et extrait avec du phénol-chloroforme (voir section). Les 3'UTR sont insérés dans le vecteur en aval du gène de la luciférase *firefly* et ce, par recombinaison avec le kit In-Fusion® HD Cloning System (Takara Bio USA, Inc.) selon le protocole du kit. Les plasmides (vecteur + insert) sont transformés dans des cellules chimio-compétentes d'*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α pour les 5'UTR et dans des cellules d'*E. coli* Stellar™ Competent Cells (Takara Bio USA, Inc.) pour les 3'UTR. La transformation se fait par choc thermique à 42 °C pendant 45 secondes à 1 minutes, les bactéries sont placées 1 heures à incubation dans du LB ou du SOC medium (Takara Bio USA, Inc.) sans antibiotiques, étalées sur boîte et placées à 37 °C pendant 24 heures (section 2.2). Suite à l'incubation, les clones sont testés par PCR sur colonies avec le programme suivant : dénaturation initiale de 5 minutes à 95 °C, une seconde dénaturation de 30 secondes à 95 °C, une renaturation de 1 minute à T_m-5, une élongation de 1 minute en fonction de la taille du produit attendu et de la polymérase utilisée, à 72 °C les trois dernières étapes sont répétées 35 fois pour finir par une élongation finale de 5 minutes à 72 °C. Les amorces 35SProm-Fwd 5'-CCACTATCCTTCGCAAGACC-3' (T_m 55,3 °C) et pEAQ-Fluc Rev 5'-CCGGGCCTTTCTTTATGTTT-3' (T_m 53,3 °C)

confirment les clones portant les inserts 5'UTR. L'amorce pEAQ-Fluc 3'Fwd 5'-CAGTCAAGTAACAACCGCGA-3' (Tm 55,3 °C) ainsi que les amorces spécifiques anti-sens de chaque fragment 3'UTR (voir tableau) confirment les clones portant les inserts 3'UTR.

2.5 Extraction phénol-chloroforme

Tableau 2.3 Amorces PCR utilisées pour l'amplification des régions UTR à partir des gBlocks et pour les analyses d'expression par qPCR

Amorces	Séquences 5' -> 3'	Tm	Cible
Fwd-AtLCR67-3UTR-Inf-Sacl3:	GAGGGGCGAGGGGCGAGCTCCCCGGGTCTACCTCTACCAAGAGCTCTTAATG	74 °C	3'UTR-AtLCR67
Rev-AtLCR67-3UTR-Inf-Sacl3:	ATTTCAGCGAATTCGAGCTCCCTAGGTACGTAAAAGTTTATC	57 °C	
Fwd-AtLEA-3UTR-Inf-Sacl3:	GAGGGGCGAGGGGCGAGCTCCCCGGGTGAGGAAAGATACA	66 °C	3'UTR-AtLEA
Rev-AtLEA-3UTR-Inf-Sacl3:	ATTTTCAGCGAATTCGAGCTCCCTAGGACGAAAAGAAATAGAATCA	62 °C	
Fwd-AtCIPK5-3UTR-Inf-Sacl3:	GAGGGGCGAGGGGCGAGCTCCCCGGGATCAGTAGTTTTGGT	67 °C	3'UTR-AtCIPK5
Rev-AtCIPK5-3UTR-Inf-Sacl3:	ATTTTCAGCGAATTCGAGCTCCCTAGGATCTGAACCCAAATTATT	62 °C	
Fwd-AtHB11-3UTR-Inf-Sacl3:	GAGGGGCGAGGGGCGAGCTCCCCGGGTTATTAGGTCGC	68 °C	3'UTR-AtHB11
Rev-AtHB11-3UTR-Inf-Sacl3:	ATTTTCAGCGAATTCGAGCTCCCTAGGAGATAAAATCGACATTGAT	61 °C	
Fwd-AtTOR-3UTR-Inf-Sacl3:	GAGGGGCGAGGGGCGAGCTCCCCGGGATGGGTCATCTG	68 °C	3'UTR-AtTOR
Rev-AtTOR-3UTR-Inf-Sacl3:	ATTTTCAGCGAATTCGAGCTCCCTAGGAGTAAAAAAGGTGACCTGC	67 °C	
Fwd-AtLCR67-5UTR:	GTTACTAAGCTTAAACTAAACATATATACATCGAA	52 °C	5'UTR-AtLCR67
Rev-AtLCR67-5UTR:	ACTTAAGGATCCTGACCTAGGGACTA	57 °C	
Fwd-AtLEA-5UTR:	GTTACTAAGCTTAGAGAAAAGGATCTC	51 °C	5'UTR-AtLEA
Rev-AtLEA-5UTR:	ACTTAAGGATCTCGCTAGGTTTAT	56 °C	
Fwd-AtCIPK5-5UTR:	GTTACTAAGCTTATTGACACTTCT	51 °C	5'UTR-AtCIPK5
Rev-AtCIPK5-5UTR:	ACTTAAGGATCCCTTCTAGGTGATA	55 °C	
Fwd-AtHB11-5UTR:	GTTACTAAGCTTGTAGGGGACCTTAT	55 °C	5'UTR-AtHB11
Rev-AtHB11-5UTR:	ACTTAAGGATCCGCTCTAGGATTGT	59 °C	
Fwd-AtTOR-5UTR:	GTTACTAAGCTTAAAAAATGAAAATATTGTATT	48 °C	5'UTR-AtTOR
Rev-AtTOR-5UTR:	ACTTAAGGATCCCCACCTAGG	53 °C	
Fwd-NbTOR-qPCR:	CAGGGAGGTTGCAGAAATTG	60 °C	NbTOR (Exon6, Niben101Scf00953g08007.1)
Rev-NbTOR-qPCR:	CGATCACGCAGGAAATGA	59 °C	
Fwd-NbCIPK5-qPCR:	CAATTCCAAGGGCGTTTTC	60 °C	NbCIPK5 (Niben101Scf01545g02007.1)
Rev-NbCIPK5-qPCR:	AGGGGATGAAGGTGATTCC	60 °C	
Fwd-NbBIG-qPCR:	TTAAGACTTCCCGCTCCATC	59 °C	NbBIG (Exon5, Niben101Scf06560g02002.1)
Rev-NbBIG-qPCR:	CCAGCAACAGCATTACCTGA	60 °C	

Un volume de phénol : chloroforme, alcool isoamylique (25 :24 :1) (BioShop, ON, CANADA) est ajouté par volume d'échantillon, puis on centrifuge 10 minutes à 13 000 RPM. La phase supérieure est récupérée, 3,6 µl de NaOAc 3M à pH 6.7 ainsi que 2,5 volume d'éthanol 100 % à 4 °C y sont ajoutés. Les tubes sont placés sur glace, ou à -20 °C pendant 5 à 10 minutes et centrifugés pendant 10 minutes à 14 000 RPM. Le surnageant est retiré sans déranger le culot d'ADN. L'étape de lavage nécessite 150 µL d'éthanol 75 % fait avec de l'eau sans RNase, puis une centrifugation de 2 minutes à 14 000 RPM. Le lavage est répété, puis les échantillons sont laissés à sécher pendant 10 minutes, puis re-suspendus dans environ 20 µL d'eau.

2.6 Analyses protéiques

2.6.1 Agroinfiltration dans *Nicotiana benthamiana*

Les infiltrations à *Agrobacterium tumefaciens* sont réalisées sur *N. benthamiana* pTA50 et WT âgées de 4 semaines (section 2.2). Des cultures bactériennes de 18 heures avec agitation en milieu LB avec antibiotiques sont centrifugées 10 minutes à 4000 g. Le culot est récupéré pour préparer un inoculum à une DO₆₀₀ finale de 0,2 dans du MgCl₂ 10 mM. L'inoculum est préparé en fonction de l'expérience et des souches *Agrobacterium tumefaciens* portant les constructions nécessaires. Les plants sont infiltrés puis placés en chambre de croissance pour une période allant de 1 à 3 jours post-infection en fonction des objectifs. Des échantillons de feuille sont ensuite récoltés pour analyse. Dans le cas de *N. benthamiana* pTA50, les surfaces foliaires précédemment agroinfiltrées sont infiltrées au DEX 32 µM, puis récoltées 6 à 24 heures plus tard.

2.6.2 Immunobuvardage de type western

Les disques foliaires sont broyés dans de l'azote liquide, une solution tampon Laemmli (UK Laemmli) (4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0.004% bleu de bromophénol, 0,125 M Tris HCl) est ensuite rajoutée aux poudres de feuilles à un ratio de 60 µL pour 30 mg de poudre. Une incubation à 95°C pendant 5 minutes s'ensuit, pour finir par une centrifugation de 5 minutes à 13 000 g. Ces traitements ont pour effet de dénaturer les protéines ainsi que de leur conférer une charge négative. Après centrifugation, le surnageant est chargé sur gel SDS-PAGE pendant 1 heure afin de séparer les protéines puis transféré sur une membrane PVDF (BIO-RAD, ON, Mississauga). Des anticorps monoclonaux de lapin anti-PIAMV-CP (Agdia, dilution 1:20000) suivis d'anticorps polyclonaux d'âne anti-IgG-rabbit couplés à la horseradish peroxidase (HRP) (BioLegend, 1:10000) sont utilisés pour la détection de la protéine

d'enveloppe du virus *PLAMV*. Pour la détection de la protéine fluorescente verte (GFP), on utilise un anticorps anti-GFP-HRP (Santa Cruz, 1:3000), les anticorps anti-FLAG-HRP (Sigma-Aldrich, 1:5000) pour détecter les protéines portant une étiquette FLAG comme rpl18. Les anticorps P-p70 S6 kinase α (Santa Cruz, 1 : 1000) et p70 S6 kinase α (Santa Cruz, 1 : 1000) reconnaissent respectivement la forme phosphorylée et non phosphorylée de la S6 kinase. Ces deux anticorps nécessitent une incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG-rabbit-HRP. Les anti-HA-HRP (Sigma, 1:3000) identifient l'hémagglutinine de l'influenza (HA). Après sélection avec l'anticorps ou les anticorps nécessaires, les bandes sont révélées par addition de substrat de chimioluminescence améliorée, Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad, ON, Mississauga) puis exposées sur film d'autoradiographie (PROGENE, UltiDent Scientific, QC, St. Laurent).

2.6.3 Quantification de la luciférase

Après agroinfiltration avec les constructions pEAQ-SE-F_Luc-3'UTR, pEAQ-SE-F_Luc-5'UTR, pEAQ-SE-R_luc et traitement au DEX ou traitement témoin (au $MgCl_2$), 3 disques de feuille, de *N. benthamiana* pTA50, sont récoltés pour quantifier l'expression de la luciférase. Cette expérience est effectuée avec le kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Wisconsin, USA) et en suivant le protocole du fabricant. Brièvement, les disques sont broyés dans de l'azote liquide, puis mélangés à 100 μ l de tampon d'extraction, Passive lysis Buffer 1X. Après 10 minutes de centrifugation à 13000rpm, le surnageant est récupéré et dilué à 1/3. Chaque échantillon est testé en triplicata de 10 μ l. Dans un premier temps, l'expression de la *luciférase* Firefly est quantifiée après l'ajout de 50 μ l de réactif Luciferase Assay Reagent II (Promega, Wisconsin, USA), grâce au lecteur de plaque Tecan GENios Microplate Reader (Tecan Trading AG, Switzerland). Dans un deuxième temps, 50 μ l de réactif Stop et Glo® Reagent (Promega, Wisconsin, USA) permettent la quantification de la *luciférase* Renilla toujours avec le même lecteur de plaque. Enfin, les valeurs d'expression de la *luciférase* Firefly sont normalisées avec celles de la *luciférase* Renilla de l'échantillon correspondant. Une

seconde étape de normalisation est nécessaire pour comparer les niveaux d'expression de chaque condition avec la condition contrôle. Cette dernière est un plant de pTA50 infiltré avec un mix *A. tumefaciens* C58C1 portant les constructions pEAQ-SE-F_luc et pEAQ-SE-R_Luc, et traité au MgCl₂ 10 mM. Les analyses statistiques sont réalisées par une ANOVA à composante multiple ***P<0,001.

2.7 Analyse d'expression génique

2.7.1 Immunoprécipitation

Après traitement à la DEX (section 2.6.1) ou au MgCl₂ 10 mM, les feuilles de *N. benthamiana* p50/rpl18 sont broyées dans de l'azote liquide et immunoprécipitées selon le protocole de Mustroph, Juntawong, et Bailey-Serres (2009a). Un tampon d'extraction de polysome [Tris HCl 2 M pH 9, KCl 2 M, EGTA 0,5 M pH 8, MgCl₂ 1 M, Sodium deoxycolate 10% (p/v), Polyoxyéthylène 10 tridécyléther 20% (v/v), Détergent mix 20% (v/v) (Brij-35 20% (p/v), Triton X-100 20% (v/v), IgepalCA630 20% (v/v), Tween-20 20% (v/v)) dithiothréitol 1 M, PPI 100X, Cycloheximide 50 mg/mL, Chloramphénicol 50 mg/mL, inhibiteur d'ARN] est ajouté aux poudres d'échantillons pour un ratio de 100 mg de poudre pour 200 µl de détergent. Une série de centrifugations permet de séparer les débris solides. Alors que 10% du volume de chaque échantillon est mis de côté pour une extraction d'ARN total, le reste est homogénéisé avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA (Sigma-Aldrich). Après une incubation avec agitation de 30 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré et lavé avec un tampon de lavage (Tris HCl 2 M pH 9, KCl 2 M, EGTA 0,5 M, MgCl₂ 1 M, Cycloheximide 50 mg/mL, Chloramphénicol 50 mg/mL, inhibiteur d'ARN, DTT 1 M, PPI 100X) et homogénéisé avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-FLAG (EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, Sigma- Aldrich). Après une incubation de 2 heures avec agitation à 4°C, le surnageant est récupéré pour une extraction d'ARN (voir section 2.7.2).

2.7.2 Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative

L'ARN est extrait des échantillons obtenus suite à l'immunoprécipitation (section 2.7.1) au RiboZol™ RNA Extraction Reagents jusqu'à la précipitation de l'ARN, puis sur colonnes grâce au kit Quiagen RNeasy selon le protocole de chaque fabricant. L'ARN est converti en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse avec la Superscript II™ Reverse Transcriptase Invitrogen, en suivant les instructions du fabricant. L'expression relative des homologues des gènes *BIG* (Niben101Scf06560g02002.1), *TOR* (Niben101Scf00953g08007.1) et *CIPK5* (Niben101Scf01545g02007.1) chez *N. benthamiana* est quantifiée par amplification quantitative (qPCR). Les réactions de qPCR sont réalisées avec de l'ADNc dilué à 1/3 dans de l'eau et ajouté à un mélange de 10 µM d'amorces (sens et anti-sens) et de Advanced qPCR Master Mix avec Supergreen LO-ROX (Wisent), chacune réalisée en triplicata. Le programme commun consiste en une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C suivi d'une dénaturation de 4 secondes à 95°C et d'une hybridation de 4 secondes à 60°C (cette température peut varier en fonction du T_m de chaque amorce) ce 38 fois. L'amplification se poursuit à 95°C pour 10 secondes, 5 secondes à 65°C et enfin 5 secondes à 95°C. Les amorces utilisées sont : Fwd NB-BIG et Rev NB-BIG (Tableau 2.3) qui donnent un produit de 259 pb dans l'exon 5 de *BIG*, Fwd NB-CIPK5 et Rev NB-CIPK5 (Tableau 2.3) qui forment un produit de 122 pb chez *CIPK5* (Tableau 2.3), Fwd-NbTOR-qPCR-2 et Rev-NbTOR-qPCR-2 (Tableau 2.3) qui amplifient un produit de 108 pb dans l'exon 6 de *TOR*. Les gènes de références utilisés pour normaliser les résultats sont *UBQ* (Niben101Scf19214g00010.1), gène codant pour l'ubiquitine ainsi que *VATP* (Niben101Scf02594g10014.1) gène codant pour une ATPase de type V. Les amorces utilisées pour ces gènes sont UBQFor 5'-CATCCAAATATCAACAGTAATGG-3' (T_m 59°C) et UBQRev 5'-CAAAAGTGAGCAGATTGAAAGC-3' (T_m 62°C) pour *UBQ*, cette paire amplifie un produit de 108 pb, VATPFor 5'-CTGGTGTTTTGGGTATTTATGG-3' (T_m 61°C) et VATPRev 5'-GCAAGACCACAAGCAAGACC-3' (T_m 64°C) qui forment un produit de 130 pb dans le gène *VATP*. Les C_t de chaque échantillon et pour chaque réaction sont convertis en expression relative (ER). Pour cela, une normalisation est d'abord effectuée sur les C_t obtenus

pour chaque échantillon (C^t_1) et les C^t obtenus pour la condition contrôle (C^t_0) : $C^t_1 - C^t_0 = \Delta C^t_1$. Puis une seconde normalisation est effectuée et sur les C^t obtenus pour chaque gènes références (C^t_{ref}), et les C^t obtenus pour la condition contrôle sur les gènes de références (C^t_{0ref}) : $C^t_{ref} - C^t_{0ref} = \Delta C^t_{ref}$. La seconde étape consiste à déterminer l'expression relative en prenant en compte l'efficacité des amorces (EA) $ER = EA1^{(\Delta C^t_1)} / EAref^{(\Delta C^t_{ref})}$. L'analyse statistique se fait par une ANOVA à comparaison multiple *** $P < 0,001$, chaque valeur acquise après traitement au DEX est comparée aux valeurs après traitement témoin.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Fonction des gènes candidats dans la réponse de défense

Il a été établi par Meteignier *et al.* (2017) que de nombreux gènes (Tableau 1) sont régulés strictement au niveau de la traduction durant une réponse de défense. Pour valider l'implication de ces candidats dans l'immunité végétale, la susceptibilité de lignées transgéniques KO (*knock out*) pour les gènes candidats, à l'infection contre différents agents pathogènes a été testée. Trois pathosystèmes ont été utilisés, comprenant toujours la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, et les pathogènes *Pto* DC3000 (avirulent ou virulent), *H. a.* et *PLAMV* dans chacun des systèmes. Les gènes sélectionnés pour la validation sont ceux qui présentaient une TE significativement différente, sans changement notable au niveau transcriptionnel (GUTT de défense, ou commun). La majeure partie des lignées transgéniques utilisées dans ces expériences possèdent un T-DNA dans le gène en question. Les lignées TOR RNAi (Menand *et al.*, 2002) et TOR OX (Deprost *et al.*, 2007), par contre, sont respectivement des transgéniques *Knock down* et surexprimant le gène. De plus, la lignée *big doc-1* (Li *et al.*, 1994) comporte une mutation ponctuelle dans le locus *DARK OVEREXPRESSION OF CAB* (DOC) faisant partie de l'ORF *BIG*. L'infection de plants mutants est une méthode utilisée de manière extensive pour démontrer l'impact d'un ou plusieurs gènes dans différentes voies de défenses (Katagiri *et al.*, 2002). Bien que certains lots d'infections avec *Pto* DC3000 aient été effectués par d'autres membres du laboratoire, comme c'est le cas pour les mutants TOR OX, TOR RNAi, *cipk5*, *cipk25*, *big* et *cct2*, le reste des mutants ont été testés par moi-même, ainsi que les deux autres pathosystèmes et tous les résultats seront présentés ici.

3.1.1 Fonction des gènes candidats dans le pathosystème *A.thaliana* - *P. syringae*

DC3000

Différents mutants d'*A. thaliana* pour les gènes candidats ont été infectés avec *Pto* EV, ou exprimant AvrRpm1. Le dénombrement bactérien 3 jours après infection (dpi) avec *Pto* AvrRpm1 montre une susceptibilité accrue des lignées *big*, *cct2* et *rrtfl* (Figure 3.1). Ces gènes ont donc un rôle dans la résistance induite par RPM1. Les trois lignées arborent tout de même un degré de susceptibilité différent. Le dénombrement bactérien de *big* est plus élevé que celui du type sauvage Col-0 d'un log. *cct2* et *rrtfl*, eux, présentent une différence significative avec le WT (* $P < 0.05$), mais elle n'est pas aussi impressionnante que celle de *big*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'analyse du traductome (Tableau 1). En effet, *CCT2* et *RRTF1* possèdent une TE presque nulle en condition contrôle et une TE positive en défense (GUTT de défense), tandis que le transcrit de *BIG* semble être inhibé en condition contrôle, et non en condition de défense (Tableau 1). Ces résultats sous-entendent que la traduction active de ces trois ARNm est nécessaire à l'établissement de la ETI.

À l'opposé, le dénombrement bactérien 3 dpi des lignées *cipk5-1* et *cipk5-2* présente une résistance accrue à *Pto* DC3000 AvrRpm1 (Figure 3.1). Avec une TE positive en condition de contrôle, et négative après activation de RPM1, il semble que *CIPK5* soit un régulateur négatif de la défense. Quant à *CIPK25*, ce dernier exhibe le même patron de régulation traductionnelle que *CIPK5*, mais à un niveau d'expression beaucoup plus modéré (Meteignier *et al.*, 2017). Cette différence se reflète dans la capacité de résistance de *cipk25* à *Pto* DC3000 AvrRpm1 lorsque comparé à *cipk5* (Figure 3.1), ce qui indique qu'une perte de *CIPK25* n'affecte pas la réponse de défense. Les mutants TOR RNAi et TOR OX affichent des résultats intéressants suite à l'infection avec *Pto* DC3000 AvrRpm1 et EV. Comme *cipk5*, TOR RNAi est plus résistant à l'invasion bactérienne et ce, avec les deux souches de *Pto* DC3000. Par contre, TOR

OX lui, n'est pas significativement plus susceptible. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de *TOR* et *CIPK5* est nécessaire à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace.

À travers ces dénombrements bactériens, plusieurs gènes identifiés durant l'analyse du traductome ont été validés. Ces derniers sont donc des acteurs de la réponse de défense contre une bactérie virulente et / ou avirulente chez *A. thaliana*. En accord avec les données du traductome de défense de la plante modèle, des régulateurs négatifs (*TOR*, *CIPK5* et *CIPK25*) et positifs (*BIG*, *CCT2*, *RRTF1*) du système immunitaire végétal ont été identifiés. Cependant, de nombreux mutants testés ne présentaient pas de phénotype significativement différent de Col-0, certains de ces candidats sont pourtant fortement régulés au niveau de la traduction. Il est possible que les protéines encodées par ces gènes aient un rôle dans la défense, mais qu'elles n'y soient pas indispensables ou qu'elles aient une fonction redondante.

3.1.2 Fonction des gènes candidats dans le pathosystème *A. thaliana* - *H. a.*

Les données précédemment obtenues par infection avec *Pto* DC3000 sont encourageantes, mais malgré la validation de certains gènes identifiés durant l'étude du traductome, plusieurs ne semblent avoir aucun effet notable sur la résistance contre la bactérie. Nous avons voulu par la suite examiner l'impact de ces gènes dans la voie de défense contre l'agent phytopathogène biotrophe obligatoire, *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*H. a.*). La souche de *H. a.* utilisée ici est virulente pour l'écotype Col-0, il s'agit d'*H. a.* Noco2. Suite à l'infection avec *H. a.* Noco2, on observe que : le dénombrement de spores à 12 dpi, des mutants *cct2* et *big doc-1* indique une susceptibilité supérieure à celle de Col-0 (Figures 3.2 et 3.3). C'est aussi le cas dans un groupe d'expériences séparées pour les mutants *lea* et *tpr* (Figures 3.2 et 3.5). Les résultats obtenus avec *cct2* et *big doc-1* sont concordants avec ceux obtenus lors des essais avec *Pto* DC3000, ce qui suggère que *CCT2* et *BIG* sont nécessaires à la résistance basale et de type NB-LRR d'*A. thaliana*.

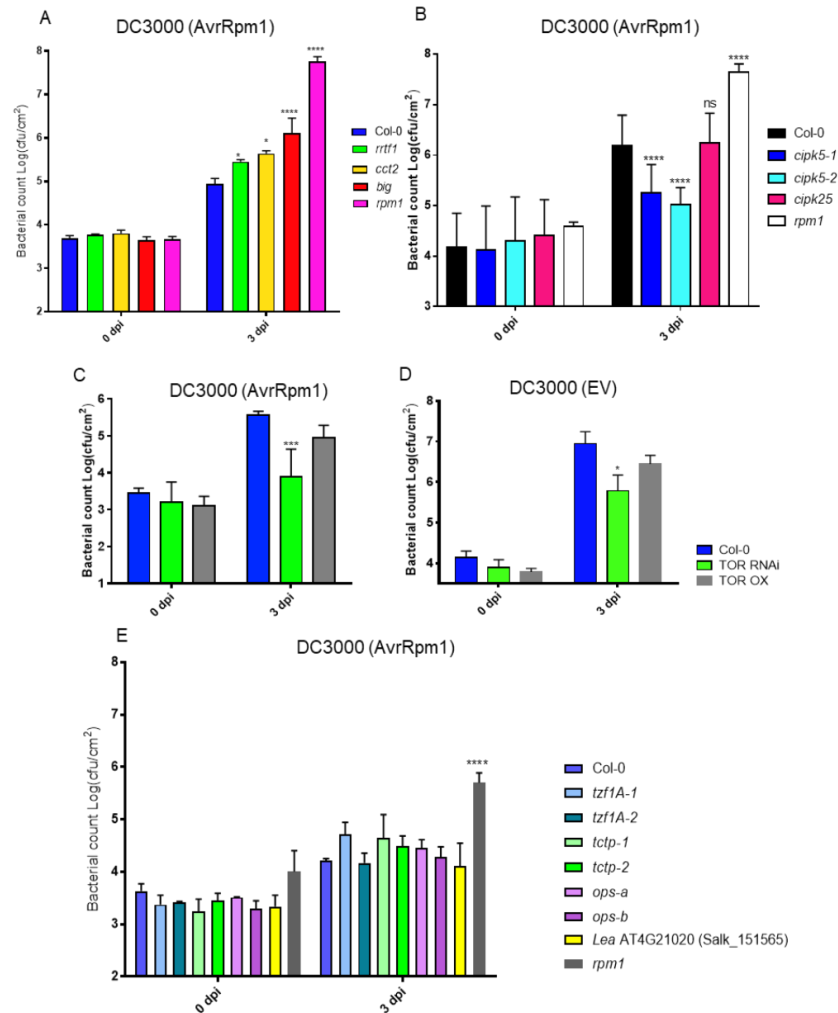


Figure 3.1 : Infection *Pseudomonas* sur de multiples lignées d'*A. thaliana* KO pour des gènes candidats.

Les barres représentent le dénombrement bactérien 0 et 3 dpi sur une échelle logarithmique. Col-0 et *rpm1* sont des lignées contrôles. Les moyennes ont été calculées avec un minimum de trois réplicats biologiques indépendants et les barres d'erreurs représentent l'erreur-type. Les astérisques indiquent une différence significative avec une valeur $P < 0.05$. (A) Mutants infectés avec *Pto* DC3000 AvrRpm1 montrant un nombre d'UFC (Unités formatrices de colonies) supérieur au type sauvage à 3 dpi. (B) Différents mutants pour le gène *CIPK5* et Col-0 infectés avec *Pto* AvrRpm1 et analysés comme en (A). (C) Plantes transgéniques TOR RNAi et TOR OX (*overexpressed*) infectées avec *Pto* AvrRpm1 comme en (A). (D) Lignées TOR RNAi et TOR OX testées avec *Pto* eV et analysées comme précédemment. (E) Mutants infectés avec *Pto* DC3000 AvrRpm1 montrant un nombre d'UFC non significativement différent du type sauvage à 3 dpi.

Les données d'infections de *H. a. Noco2* obtenues avec *lea* et *tpr* sont très intéressantes car tous deux n'ont donné aucun effet significatif lors de l'infection avec *Pto* DC3000. Durant l'analyse du traductome, *LEA* possède une TE positive après traitement au DEX, ce qui suggère que *LEA* est requis pour la réponse de défense basale des plantes. Cependant il est important de noter que *LEA* est connue pour exercer un rôle dans la résistance aux chocs abiotiques, dont le froid (Tollete *et al.*, 2007). Or, le processus d'infection avec *H. a.* nécessite une incubation à 18°C, ce qui pourrait expliquer la prolifération accrue de spores sur le mutant dans de telles conditions et l'absence de phénotype lors de l'infection avec *Pto* DC3000 (section 3.1.1). À l'opposé, *TPR* (AT1G07280) a une TE proche de 0 en condition contrôle, et négative après traitement au DEX.

Ces résultats sont difficiles à expliquer, il pourrait exister plusieurs raisons à cette observation; (1) AT1G07280 est strictement nécessaire à la PTI, et a un effet néfaste sur la ETI, ou (2) il fait partie d'une boucle de rétroaction. Mais ces hypothèses sont à confirmer. Les mutants *cipk5-1* et *cipk5-2* (qui sont deux lignées T-DNA indépendantes) arborent les mêmes patrons de résistance à *H. a. Noco2*, que ceux obtenus avec *Pto* DC3000 (Figures 3.2 et 3.3). Ces résultats pointent vers l'hypothèse que *CIPK5* est un régulateur négatif de la ETI, mais aussi du mécanisme de défense basale d'*A. thaliana*. Enfin, comme précédemment testé avec *Pto* DC3000, *TOR* RNAi est plus résistant à *H. a. Noco2* que le témoin Col-0. Il est à noter ici que le mutant *TOR* OX qui ne présentait aucun phénotype intéressant lorsque infiltré avec la bactérie, possède une susceptibilité accrue à *H. a. Noco2* (Figures 3.2 et 3.4). Cette observation sous-entend que *TOR* agisse en tant que régulateur négatif de la ETI, mais aussi de la PTI.

En plus d'être impliqués dans la voie de type NB-LRR, plusieurs candidats testés ici ont aussi un impact sur la voie de défense basale. C'est le cas de *TOR*, *CIPK5*, *BIG* et *CCT2*, qui conservent le même patron de susceptibilité ou de résistance que durant l'invasion de *Pto* DC3000. Ajouté à ça, deux mutants n'ayant montré aucun phénotype avec *Pto* DC3000, sont plus susceptibles à *H. a. Noco2*. En effet, *LEA* et *TPR* ont un rôle dans la PTI, mais ne semblent pas être nécessaires à la ETI.

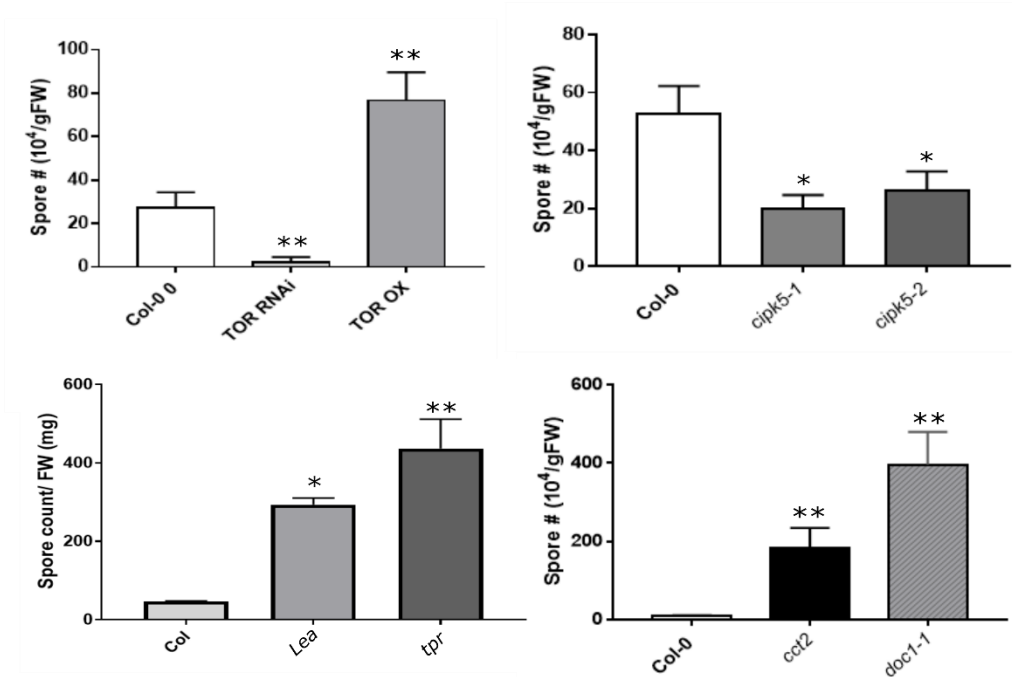


Figure 3.2 : Infection *H. a. Noco2* sur de multiples lignées KO d'*A. thaliana* pour une sélection de gènes candidats. Dénombrement de spores par gramme de matière fraîche sur les lignées indiquées, infectées avec HpA Noco2, à 12 dpi sur quatre expériences indépendantes, toutes avec un inoculum initial qui varie entre 2×10^5 et 4×10^5 spores/mL. Les moyennes ont été calculées avec un minimum de trois réplicats biologiques indépendants et les barres d'erreurs représentent l'erreur-type. Les statistiques sont effectuées par ANOVA à composante multiple *** $P < 0,001$, chaque génotype est comparé au type sauvage Col-0.

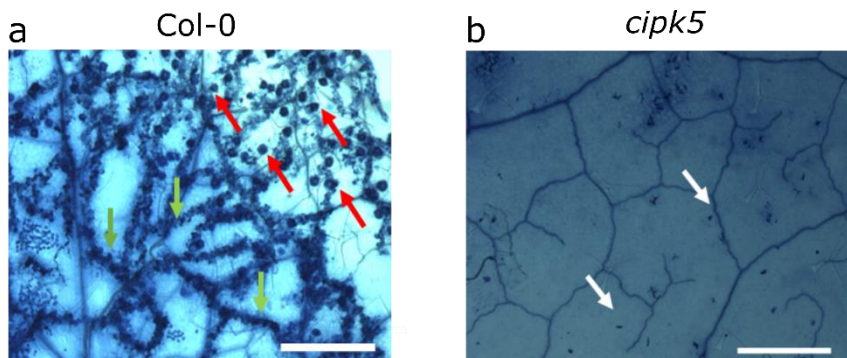


Figure 3.3 : Coloration au bleu de Trypan de feuilles de Col-0 et *cipk5* infectées à *H. a. Noco2* avec un inoculum proche de 4×10^5 spores/mL. Les flèches blanches indiquent la HR, les rouges les sporangiospores et les vertes les hyphes.

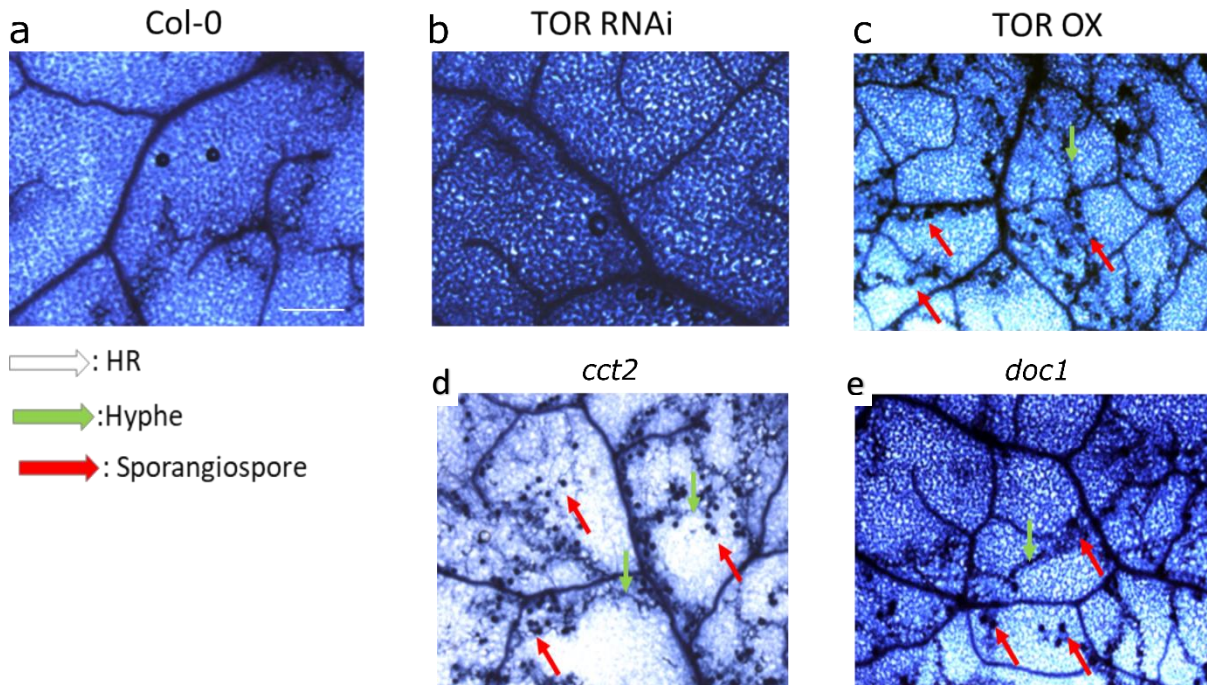


Figure 3.4: Coloration au bleu de Trypan de plants infectés avec *H. a. Noco2*. Photos de feuilles de (a) Col-0, (b) TOR RNAi, (c) TOR OX, (d) *cct2* et (e) *doc1* colorées au bleu de Trypan 12 dpi avec Hpa Noco2. Cette coloration met en avant les hyphes, oospores ainsi que la mort cellulaire.

3.1.3 Fonction des gènes candidats dans le pathosystème *A. thaliana* – *PLAMV*

Comme mentionné plus tôt, on sait que l'activation d'une protéine NB-LRR, peut mener à la répression de la traduction de transcrits viraux (Meteignier *et al.*, 2016). Suite à cette observation, nous avons voulu examiner l'impact potentiel que pourraient avoir les candidats régulés au niveau de la traduction sur la résistance virale. Afin d'observer l'effet de la mutation de certains gènes candidats sur l'infection virale, nous y avons mesuré la propagation de 3 souches différentes du virus *Plantago asiatica mosaic virus* (*PLAMV*); *PLAMV*-AvrRpm1, *PLAMV*-AvrRpt2 ainsi que *PLAMV*-GFP comme témoin positif. Par immunobuvardage de type western (WB), il a été possible de comparer la propagation du virus dans chaque plant grâce à un anticorps anti-*PLAMV*-CP (section 2.6.2).

Sept à seize jours après inoculation avec *PLAMV*-AvrRpm1, on observe aucun changement de phénotype chez de nombreux mutants (Figure 3.6). Les WB qui s'en suivent reflètent le phénotype observé, c'est-à-dire l'absence du virus chez la plupart des plants, sauf chez les témoins positifs; *rpm1*, Col-0 inoculé avec *PLAMV*-GFP et chez le mutant *cct2*. Il est cependant nécessaire de préciser que le résultat positif obtenu sur le mutant *cct2* ne survenait qu'à une faible fréquence. C'est-à-dire que sur les trois réplicats effectués, seulement un essai présentait un résultat positif.

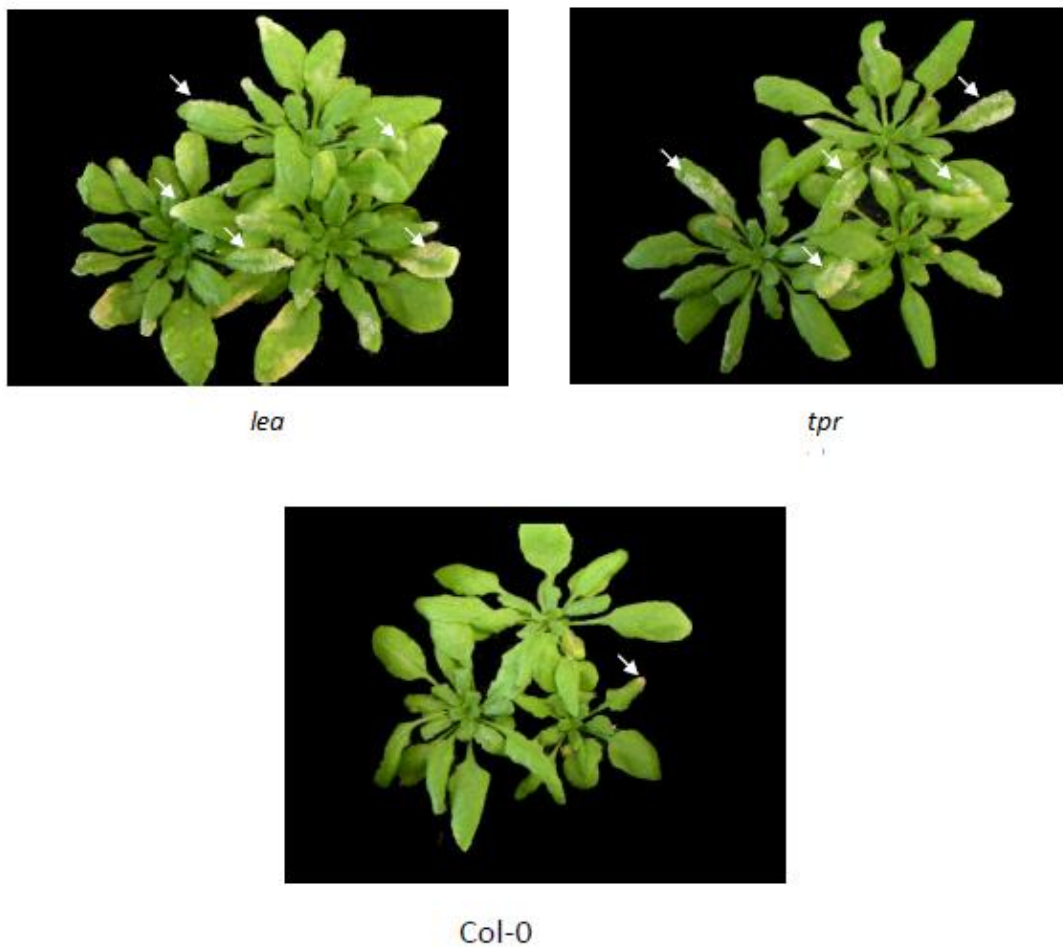


Figure 3.5 : Infection avec *H. a.* sur les mutants *lea* et *tpr*. Photos de plantes mutantes pour les gènes LEA, TPR ainsi que Col-0, 12 dpi après infection avec *H. a. Noco2*. Les flèches blanches indiquent la présence de spores.

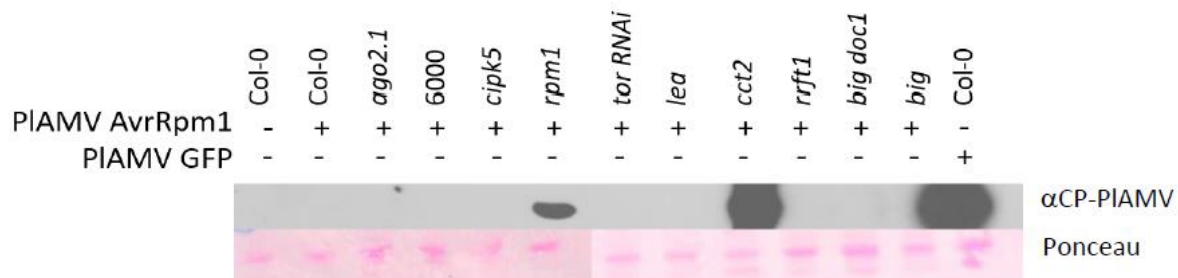


Figure 3.6 : Infection avec PIAMV AvrRpm1 de mutants d'*A. thaliana*. Western blot anti CP-PIAMV (Coat protein) sur des mutants d'*A. thaliana* infectés avec PIAMV AvrRpm1 et GFP, à 16 dpi

Même après avoir réitéré le réplicat, il a été impossible de retrouver le phénotype susceptible. Il est probable que la protéine soit nécessaire à la résistance virale, mais pas indispensable. Il est connu que RPM1 tend à enclencher une réponse de défense plus robuste que celle induite par RPS2, ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype lors de l'infection avec *PIAMV*-AvrRpm1. Les mêmes lignées mutantes ont donc été infectées avec *PIAMV*-AvrRpt2. Après une incubation de 16 jours, les WB révèlent une accumulation virale nulle, même pour *cct2* (Figure 3.7). Jusqu'à présent, de nombreux candidats régulés au niveau de la traduction durant la réponse de défense chez *A. thaliana* ont un rôle dans la résistance végétale. Suite aux résultats obtenus lors des essais viraux, il semble que CCT2 soit la seule protéine identifiée lors de l'analyse du traductome, qui est nécessaire à la réponse antivirale.

Les infections avec différents phytopathogènes ont permis de confirmer l'implication de nombreux candidats identifiés lors de l'étude du traductome, dans la réponse de défense de type NB-LRR, et basale d'*A. thaliana*. RRTF1 est requis pour la résistance induite par RPM1. BIG est nécessaire à l'établissement de la PTI et de la ETI. À l'opposé, la répression des transcrits de *TOR*, *CIPK5* et *CIPK25* est essentielle au déploiement des mécanismes de résistance basale et de type NB-LRR. LEA et TPR sont utiles à la résistance basale, montrant ainsi que lorsque certains candidats sont requis pour l'immunité envers plusieurs pathogènes, d'autres semblent nécessaires contre un type spécifique de pathogène.

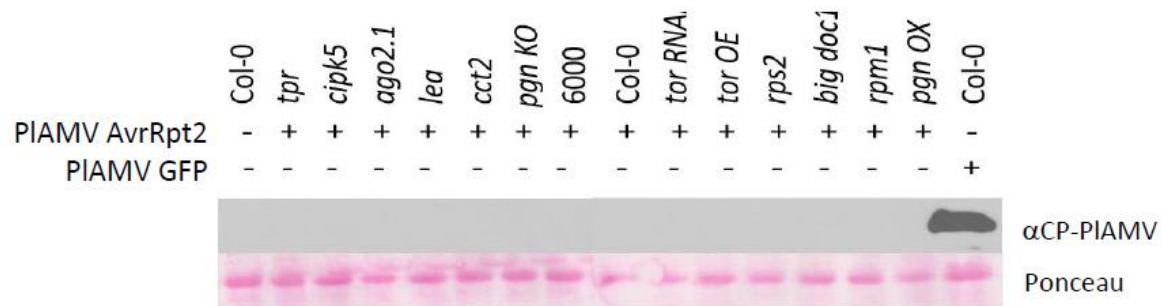


Figure 3.7 Infection avec PIAMV AvrRpt2 de mutants d’*A. thaliana*

Western blot anti CP-PIAMV (*Coat protein*) sur des mutants d’*A. thaliana* infectés avec PIAMV AvrRpt2 et GFP, à 16 dpi.

Enfin, tous ces essais infectieux ont mené à l’identification d’un nouvel acteur des systèmes de défenses d’*A. thaliana*. En effet, CCT2 est la seule protéine qui possède un rôle dans la résistance contre les trois agents pathogènes testés.

3.2 Régulation traductionnelle des gènes candidats

Grâce aux résultats obtenus précédemment, on sait que la traduction de nombreux ARNm endogènes est régulée suite à l’activation d’une protéine NB-LRR. On sait aussi que cette régulation ne se reflète pas dans la quantité d’ARNm présent dans la cellule hôte. Cela sous-entend que ces transcrits seraient ciblés par un ou des mécanismes de régulation traductionnelle. La traduction est un des processus biologiques les plus régulés car il est très énergivore. Il existe donc plusieurs mécanismes de régulation traductionnelle connus qui ont un vaste éventail de cibles dont plusieurs sont listées plus haut. Suite à une étude de Munusamy *et al.* (2017), on sait que beaucoup de gènes régulés strictement au niveau de la traduction possèdent des UTR en 5’ et /ou en 3’ de plus de 10 nucléotides. Ces régions jouent un grand rôle dans la capacité de traduction des transcrits, elles peuvent comporter des sites de liaison aux miRNA, des uORF, et autres régions très conservées. Afin d’identifier le ou les mécanismes qui contrôlent la traduction des gènes candidats, notre intérêt s’est donc porté sur les 5’ et 3’ UTR de ces gènes.

La stratégie employée ici est de cloner les UTR en question en amont ou en aval d'un gène codant pour la luciférase. En mesurant l'expression du gène rapporteur, il est possible de déterminer si ces régions sont ciblées par une voie de régulation traductionnelle.

3.2.1 Clonage des UTR

Afin d'évaluer le rôle des UTR de gènes candidats dans la régulation de leur traduction, les régions 5' et 3' UTR de certains candidats ont été clonées en amont, ou en aval du gène rapporteur pour la luciférase (section 2.4). La sélection s'est principalement basée sur les gènes fortement régulés au niveau de la traduction, ainsi que des gènes qui ont déjà fait l'objet de nombreuses études (Tableau 1). Elle s'est finalement portée sur les gènes candidats; *CIPK5*, *TOR*, *LCR67*, *LEA*, *BIG* et *HBII*. Le but ici est de générer deux vecteurs par gène, un comportant la région 5'UTR et l'autre avec la région 3'UTR, afin d'observer les effets de chaque UTR individuellement, ou ensemble lorsque co-exprimés. Les UTR sont synthétisés à partir de séquences retrouvées dans la banque de données TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) et Araport11 (*Arabidopsis Information Portal*).



Figure 3.8 : Séquence de la région 5'UTR de *CIPK5* chez *A. thaliana*. Les 566 premiers nucléotides (sur 2250 pb) de la séquence de *CIPK5*, incluant la région 5'UTR de 208 pb (vert), l'uORF de 96 pb (rose) et le début de la séquence codante (violet). L'UTR en 5' a été choisie suite à l'étude menée par Munusamy *et al.*, (2017) ils ont aussi identifié l'uORF grâce à l'outil *UTRscan* (Mignone *et al.*, 2002)

Les UTR en 5' et en 3' sont clonés selon deux stratégies distinctes (section 2.4 et Figure 3.10). Après avoir amplifié et digéré les 5'UTR correctement, ces derniers sont insérés dans le vecteur pEAQ-SE-F_Luc. De par leur petite taille (49 pb pour 5'UTR-LCR67 et 78 pb pour 5'UTR-LEA) plusieurs étapes du clonage furent plus complexes que prévu. Seules les régions 5'UTR de *CIPK5* et *TOR* ont pu être clonées. Même si selon Tabata *et al.*, (2000), la région 5'UTR de *CIPK5* ferait 372 bp, seulement les 208 bp en amont de la séquence codante ont été choisis selon l'étude menée par Munusamy *et al.*, (2017), cette séquence contient un petit ORF de 96 bp identifié dans la même étude (Figure 3.8). La région 5'UTR de *TOR* fait 376 bp (Theologis *et al.*, 2000) (Figure 3.9). Les autres 5'UTR ont bien été insérés dans le vecteur, mais la vérification par séquençage n'a jamais été concluante. L'intégrité de la séquence est primordiale dans ce contexte : dans l'éventualité où une mutation se serait infiltrée dans l'insert, elle pourrait perturber les potentiels mécanismes de régulation ciblant la région. La stratégie de clonage des 3'UTR implique une enzyme de fusion qui détecte les extrémités chevauchantes des fragments. Il est donc nécessaire d'amplifier les inserts avec des amorces ayant 15 nucléotides d'homologie avec les extrémités du vecteur ouvert après digestion (Figure 3.10).



Figure 3.9 : Séquence de la région 5'UTR de *TOR* chez *A. thaliana*. Les 452 premiers nucléotides (sur 8200 pb) de la séquence de *TOR*, incluant la région 5'UTR de 376 pb (rose) et le codon d'initiation (bleue). L'UTR en 5' a été choisie suite à l'étude menée par Theologis *et al.*, (2000).

La nécessité d'homologie entre l'insert et le vecteur rendrait la méthode plus efficace et précise. Malgré de très nombreuses tentatives, aucun clonage de 3'UTR n'a été complété jusqu'à la fin.

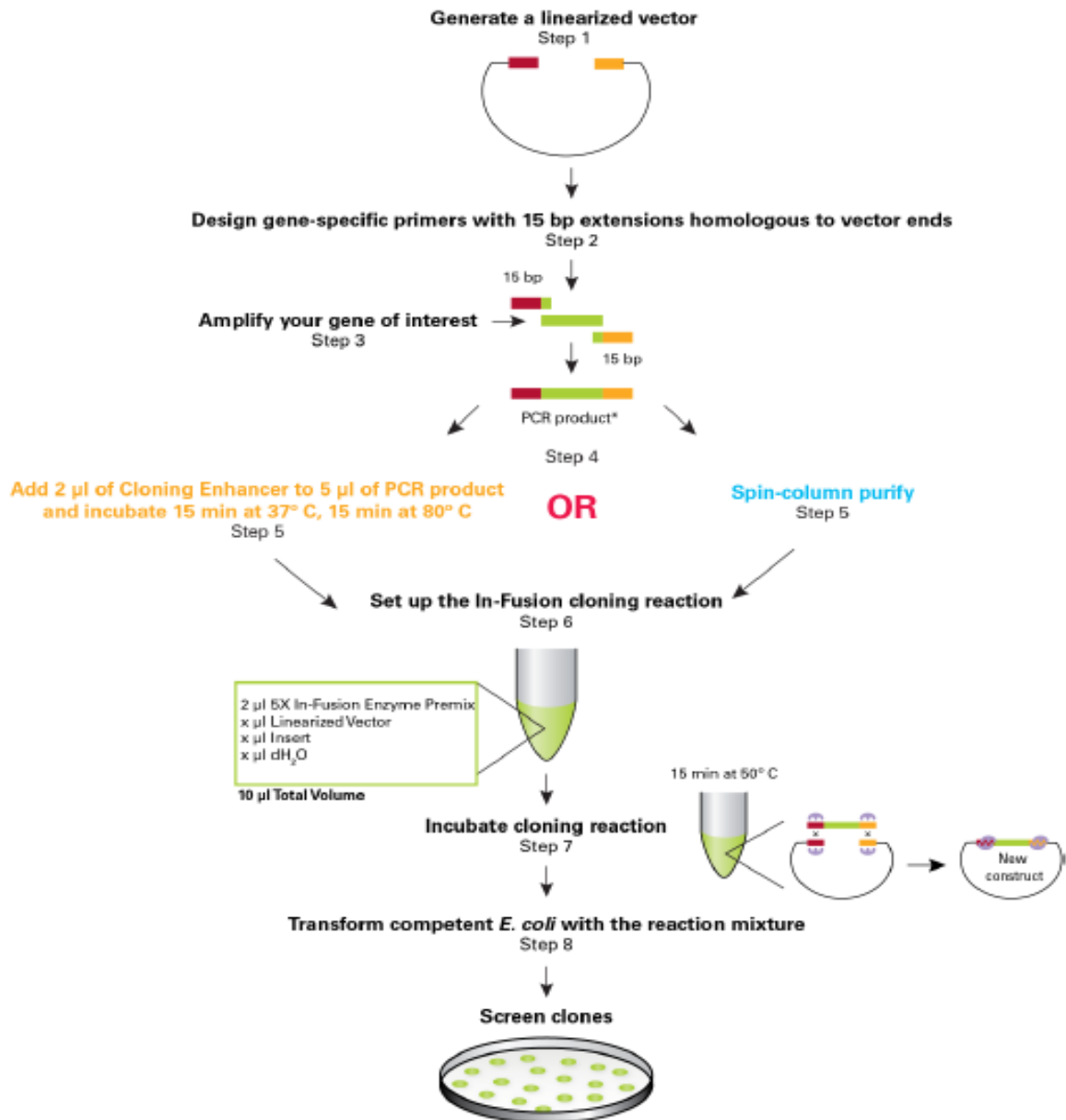


Figure 3.10 : Stratégie de clonage In-fusion (Tirée de Clontech, 2012) (voir texte pour détails)

L'étape limitante semble être la digestion du vecteur, car après transformation des plasmides contenant l'insert, le taux de clones faux positifs est très élevé. Puisque la méthode choisie ne repose pas sur une ligation, il a été conclu que la digestion du vecteur faisait défaut. Cependant, après plusieurs étapes de vérification quant à l'état de digestion du vecteur comme la migration sur gel du plasmide digéré, la transformation du plasmide ouvert dans *E. coli* DH5 α , etc. le clonage fut toujours infructueux. Dû au manque de temps, les clonages n'ont pas été poursuivis, mais les expériences de quantification de luciférase ont tout de même été effectuées sur les vecteurs pEAQ-SE-F_Luc-5'UTR-CIPK5 et pEAQ-SE-F_Luc-5'UTR-TOR.

3.2.2 Quantification de l'expression de la luciférase

La quantification de l'expression d'un gène rapporteur, ici la luciférase, est une méthode qui a été adaptée de son utilisation première qui visait à examiner la régulation transcriptionnelle de gènes par des promoteurs ou facteurs de transcription. La technique est maintenant couramment utilisée pour déterminer la présence de site de liaison aux miRNA (Jin *et al.*, 2013).

3.2.2.1 Région 5'UTR de CIPK5 et TOR

Les régions transcrites, mais non traduites en 5' des gènes *CIPK5* et *TOR* ont été clonées en amont d'un gène rapporteur dans le vecteur pEAQ-SE-F_Luc. Le gène rapporteur en question code pour la luciférase *firefly* et la quantification de son expression permet d'évaluer l'effet des 5'UTR sur la traduction du gène correspondant. Chaque construction a été transformée dans *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, puis infiltrée dans *N. benthamiana* pTA50 (section 2.6.1). La lignée transgénique *N. benthamiana* pTA50 possède le gène codant pour l'Avr P50 qui est la réplicase de *TMV*, sous un promoteur inductible au DEX (Aoyama et Chua, 1997). Elle possède aussi le transgène codant pour la protéine NB-LRR, N de *Nicotiana glutinosa*

capable de reconnaître P50 et d'induire une réponse de défense qui est exprimée constitutivement (Bhattacharjee *et al.*, 2009; Peart *et al.*, 2002).

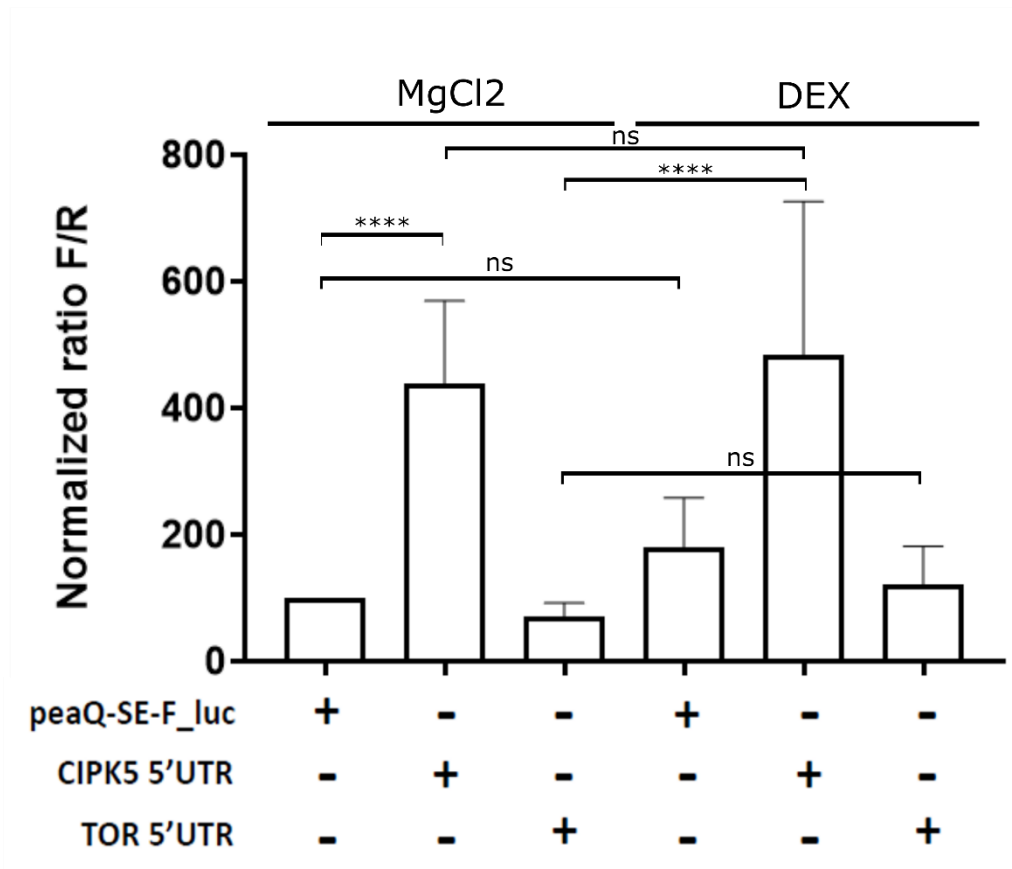


Figure 3.11 : Expression de la luciférase en condition de défense. Des plants de *N. benthamiana* pTA50 ont été co-infiltrés avec *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 portant le gène de luciférase *Firefly* la région 5'UTR de TOR ou de CIPK5 et avec C58C1 portant le gène de luciférase *Renilla*. L'expression de la luciférase est mesurée 3 jours après infiltration puis 6 heures après traitement au DEX (30 uM) ou au MgCl₂ (10 mM). La quantification se fait par normalisation du niveau d'expression de *Firefly* sur celui de *Renilla* qui agit ici comme contrôle interne. Les moyennes ont été calculées avec un minimum de trois réplicats biologiques indépendants et les barres d'erreurs représentent l'erreur-type. Les statistiques sont effectuées par ANOVA à composante multiple ***P<0,001, chaque génotype est comparé au type sauvage Col-0. ns : Non-significatif.

La méthode utilisée ici nécessite la co-infiltration du même vecteur, mais qui possède le gène de la luciférase *renilla* qui agit comme contrôle interne et permet la normalisation des résultats.

Suite à la quantification de la luciférase, on n'observe aucune différence significative entre la condition contrôle (MgCl₂) et en défense (DEX) pour la construction pEAQ-SE-F_Luc-5'UTR-CIPK5. Cet effet est aussi observé pour le plasmide pEAQ-SE-F_Luc-5'UTR-TOR qui ne présente aucune différence d'expression entre le contrôle et le traitement au DEX (Figure 3.11). On note cependant que la présence de l'UTR de *CIPK5* semble avoir un effet considérable sur l'expression de la luciférase toutes conditions confondues, lorsque comparé au vecteur contrôle pEAQ-SE-F_Luc. Ces résultats indiquent que le 5'UTR de *CIPK5* pourrait être ciblé par un mécanisme de régulation de la traduction, mais que ce dernier ne semble pas être régi par l'établissement d'une réponse de défense de type NB-LRR. Il serait intéressant d'examiner l'effet des régions 3'UTR correspondant à ces gènes, ou même l'effet synergique que pourrait avoir la présence des deux régions 5' et 3' UTR sur la traduction.

3.2.2.2 Site de liaison au miR5021

Grâce à une étude menée par Munusamy *et al.* (2017), on sait que de nombreux gènes identifiés lors de l'analyse du traductome possèdent des sites de liaisons à plusieurs miRNA. On note que plusieurs gènes régulés au niveau de la traduction possèdent un site de liaison au miR5021 dans leur région 3'UTR. Parmi ces gènes on compte notamment AT3G54220 et AT3G25660 qui codent respectivement pour une protéine avec un domaine bZIP, et une protéine de la famille des amidases. Ces deux candidats font partis des gènes inhibés au niveau de la traduction en défense (GUTT défense). Afin d'examiner le rôle de ces régions dans la régulation post-transcriptionnelle, elles ont été clonées dans le vecteur pEAQ-SE-F_Luc par le laboratoire du Pr Martina V. Stromvik à l'université McGill. Ce plasmide contient aussi un gène rapporteur pour la luciférase *firefly*. Deux vecteurs par gène ont été générés, une construction avec la région 3'UTR intacte (*Conserve*), et une construction avec la même région, mais comportant une séquence aléatoire à la place du site de liaison au miR5021 (*Random*).

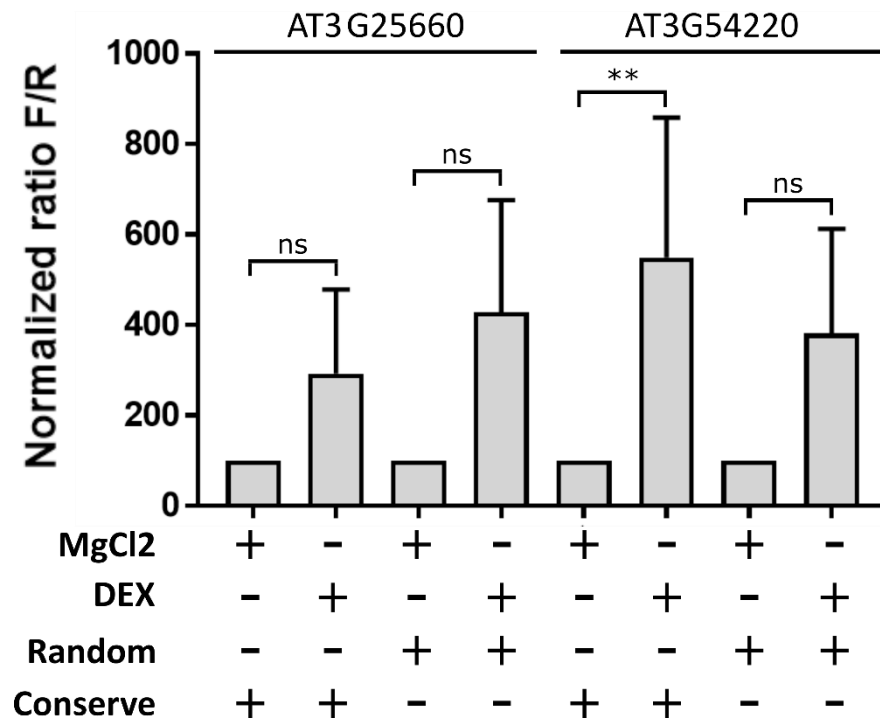


Figure 3.12 : Effet du miR5021 sur l'expression de la luciférase, avec infiltration du miR5021. Quantification de l'expression de la luciférase chez *N. benthamiana* pTA50 co-infiltré avec *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 exprimant le 3'UTR de AT3G54220 ou de AT3G25660 avec un site de liaison au miR5021 conservé (Conserve) ou remplacé par une séquence aléatoire (Random) avec le gène firefly luciférase, avec C58C1 portant le gène de Renilla luciférase et avec C58C1 exprimant le miR5021. L'expression de la luciférase est mesurée 3 jours après infiltration puis 6 heures après traitement au DEX (30 μ M) ou au MgCl₂ (10 mM). La quantification se fait par normalisation du niveau d'expression de Firefly sur celui de Renilla qui agit ici comme contrôle interne. Les moyennes ont été calculées avec un minimum de trois réplicats biologiques indépendants et les barres d'erreurs représentent l'erreur-type. Les statistiques sont effectuées par ANOVA à composante multiple **P<0,01, chaque génotype est comparé au type sauvage Col-0 traité au MgCl₂. ns : Non-significatif.

Suivant le même principe énoncé précédemment, chaque plasmide est infiltré dans *N. benthamiana* pTA50 avec ou sans co-infiltration d'une construction contenant le miR5021 lui-même. Par la suite, l'expression de la luciférase y est mesurée après traitement contrôle ou au DEX. Les données obtenues sous-entendent que le 3'UTR de AT3G54220 aurait un effet sur

la traduction du gène rapporteur, effet qui serait dépendant de l'activation de la protéine N (Figures 3.12 et 3.13). En effet, la traduction de la luciférase est plus élevée en condition de défense et en présence de l'UTR, ce qui peut se traduire par une inhibition de l'activité du miRNA. Cependant l'effet semble significatif seulement quand le miR5021 est co-infiltré (Figure 3.12).

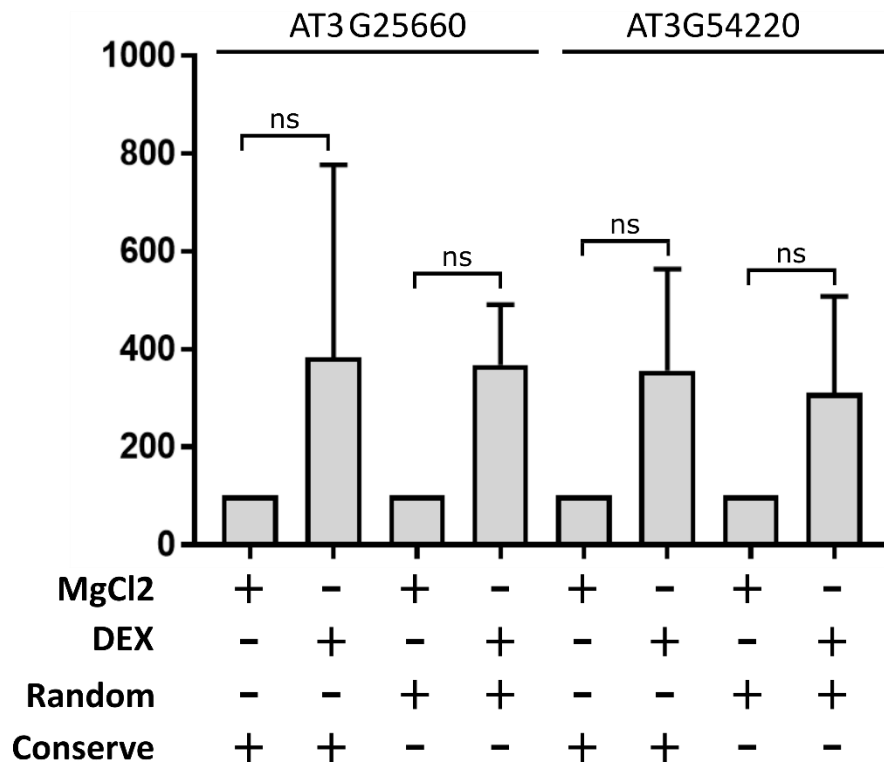


Figure 3.13 : Effet du miR5021 endogène sur l'expression de la luciférase. Quantification de l'expression de la luciférase chez *N. benthamiana* pTA50 co-infiltré avec *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 exprimant le 3'UTR de AT3G54220 ou de AT3G25660 avec un site de liaison au miR5021 conservé (Conserve) ou remplacé par une séquence aléatoire (Random) avec le gène firefly luciférase, avec C58C1 portant le gène de Renilla luciférase. L'expression de la luciférase est mesurée 3 jours après infiltration puis 6 heures après traitement au DEX (30 uM) ou au MgCl₂ (10 mM). La quantification se fait par normalisation du niveau d'expression de Firefly sur celui de Renilla qui agit ici comme contrôle interne. Les moyennes ont été calculées avec un minimum de trois réplicats biologiques indépendants et les barres d'erreurs représentent l'erreur-type. Les statistiques sont effectuées par ANOVA à composante multiple **P<0,01, chaque génotype est comparé au type sauvage Col-0 traité au MgCl₂. ns : Non-significatif.

Le but de ce volet était d'identifier un possible mécanisme de régulation de la traduction conservé à travers différents gènes candidats. Malgré la grande variabilité des données et l'absence de différence significative quant à l'expression du gène rapporteur pour le 3'UTR de AT3G25660, celui de AT3G54220 à un effet significatif. Malgré le fait que ces deux gènes aient été identifiés comme étant inhibés au niveau de la traduction après activation de RPM1, l'expérience réalisée montre une augmentation de l'expression de AT3G54220 après traitement au DEX. Il est aussi important de noter que cet effet n'est visible que lorsque le miR5021 est co-infiltré. Puisque très peu d'information est disponible sur miR5021, ce dernier pourrait alors faire partie de ces miRNA capables d'induire la traduction (Ni et Leng, 2016; Rusk, 2008). Ainsi, le taux d'expression endogène du miR5021 serait trop faible pour observer un effet.

3.3 Maintien de la régulation traductionnelle chez *Nicotiana benthamiana*.

Jusqu'à présent on sait que jusqu'à 500 gènes arborent une efficacité de traduction différente lorsque *A. thaliana* fait face à une infection nécessitant une réponse de défense de type NB-LRR (Meteignier *et al.*, 2017; Munusamy *et al.*, 2017). Les nombreux résultats précédemment obtenus indiquent que certains de ces gènes ont un rôle dans la PTI et/ou la ETI. De nouveaux acteurs des voies de résistances d'*A. thaliana* ont ainsi été identifiés. La possibilité d'une telle régulation chez d'autres espèces, elle, n'a jamais été investiguée. En effet, certains des candidats font partie de processus biologiques très conservés, comme c'est le cas de TOR (Dobrenel *et al.*, 2016) et CIPK5 (Kanwar *et al.*, 2014). Les niveaux de transcription et de traduction ont ainsi été comparés pour un groupe défini de gènes candidats, chez *N. benthamiana* et ce, après activation d'une protéine NB-LRR. Les essais ont été effectués sur la lignée transgénique *N. benthamiana* p50/L18 qui résulte d'un croisement entre les lignées pTA50 et rpL18 (section 2.7.1). En plus d'exprimer P50 et N, elle possède une protéine ribosomale rpL18 marquée avec une étiquette FLAG. Il est alors possible grâce à un anticorps anti-FLAG d'isoler les ARNm liés aux ribosomes, donc en traduction active. L'expression et

la traduction des gènes; *CIPK5*, *TOR* et *BIG* en condition contrôle et de défense a été mesurée par analyses qPCR.

3.3.1 Homologues des gènes candidats chez *N. benthamiana*

Les gènes choisis ici sont connus pour être conservés à travers les espèces. *TOR* est une kinase extensivement étudiée, et est retrouvée autant chez les animaux que les végétaux (Holz *et al.*, 2005). *BIG* joue un rôle important dans le transport de l'auxine et est un gène similaire au gène *Calossin* retrouvé chez la Drosophile, chez *Caenorhabditis elegans* et dans le génome humain (Gil *et al.*, 2001). À part chez *A. thaliana*, aucun homologue de ce gène n'a été caractérisé chez les végétaux pour l'instant. *CIPK5* est un membre de la cascade de signalisation contrôlée par TOR (Crozet *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2015), et a jusque-là été identifié chez le riz en plus de la plante modèle (Kanwar *et al.*, 2014). Cependant, aucun d'entre eux n'a encore été caractérisé chez *N. benthamiana* qui est le support biologique choisi ici. La banque de donnée de *Sol Genomics Network* qui répertorie des données sur le génome de plusieurs *Solanacées* a été utilisée pour déterminer les homologues de ces trois gènes chez *N. benthamiana*. Le génome de *N. benthamiana* dispose d'un gène identifié Niben101Scf00953g08007.1 qui possède un domaine de liaison à la rapamycine. Niben101Scf01545g02007.1 est le seul gène homologue à *atCIPK5* et est identifié *CBL-interacting protein kinase 5*. Ce dernier, similaire à *atCIPK5*, ne dispose que d'un seul exon. Enfin, l'homologue le plus proche de *atBIG* est Niben101Scf06560g02002.1 décrit comme *Auxin transport protein BIG*. Ces trois gènes ont été utilisés pour générer des amorces spécifiques utilisées lors de l'analyse qPCR (Tableau 2.3).

3.3.2 Gènes de référence

Il est connu que pour valider des données obtenues par qPCR, il est nécessaire de les normaliser par rapport au niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes de référence, dont l'expression est stable dans toutes les conditions testées. Il est donc important d'adapter la sélection du ou des gènes de référence au contexte spécifique des expériences menées. Certaines équipes se sont penchées sur l'identification de gènes de référence stables lors d'infections à une vaste gamme de virus, mais chez *A. thaliana* (Lilly *et al.*, 2011). D'autres ont basé leurs études sur *N. benthamiana* et ont identifié parmi 16 différents gènes, *PP2A*, *F-BOX* et *L23* comme étant les plus stables durant une infection virale (Liu *et al.*, 2012). Mais à ce jour, aucune étude n'a déterminé de gènes de référence adéquats dans notre cas. Le modèle utilisé ici implique que les gènes de référence choisis soient stables après traitement à la DEX, et que leurs niveaux de traduction et transcription soient similaires, puisqu'une partie des ARNm extraits sont liés aux ribosomes. La stabilité de 6 gènes couramment utilisés comme références a été mesurée après traitement au MgCl₂ (contrôle) et à la DEX (défense).

Les gènes testés ici sont les gènes codant pour EF1 α , pour la Tubuline alpha (*TUB* α), pour l'actine (*ACT*), pour l'ubiquitine (*UQB*), pour l'homologue A de la protéine vacuolaire de fusion MON1 (*SAND*) et pour l'ATPase de type V (*VATP*) (Tableau 2.3). Dans un premier temps, l'efficacité des paires d'amorces correspondant à chaque gène a été testée. Par des réactions de qPCR sur des dilutions en série il est possible de corréler la quantité d'ARN (en format logarithmique) avec la moyenne des Ct de chaque réplicat. L'efficacité des amorces peut ainsi être déterminée grâce au renvoi de la pente de la droite de régression linéaire formée à partir des données mentionnées plus tôt. Une paire d'amorces est considérée efficace lorsqu'elle présente un pourcentage $\geq 90\%$ (Tableau 2.3). Toutes les amorces testées ici ont une efficacité supérieure à 90% et seront donc utilisées pour déterminer la stabilité d'expression des différents gènes de référence sélectionnés. Après avoir effectué des réactions de qPCR pour chacun des gènes, les différents gènes ont été classés par stabilité d'expression

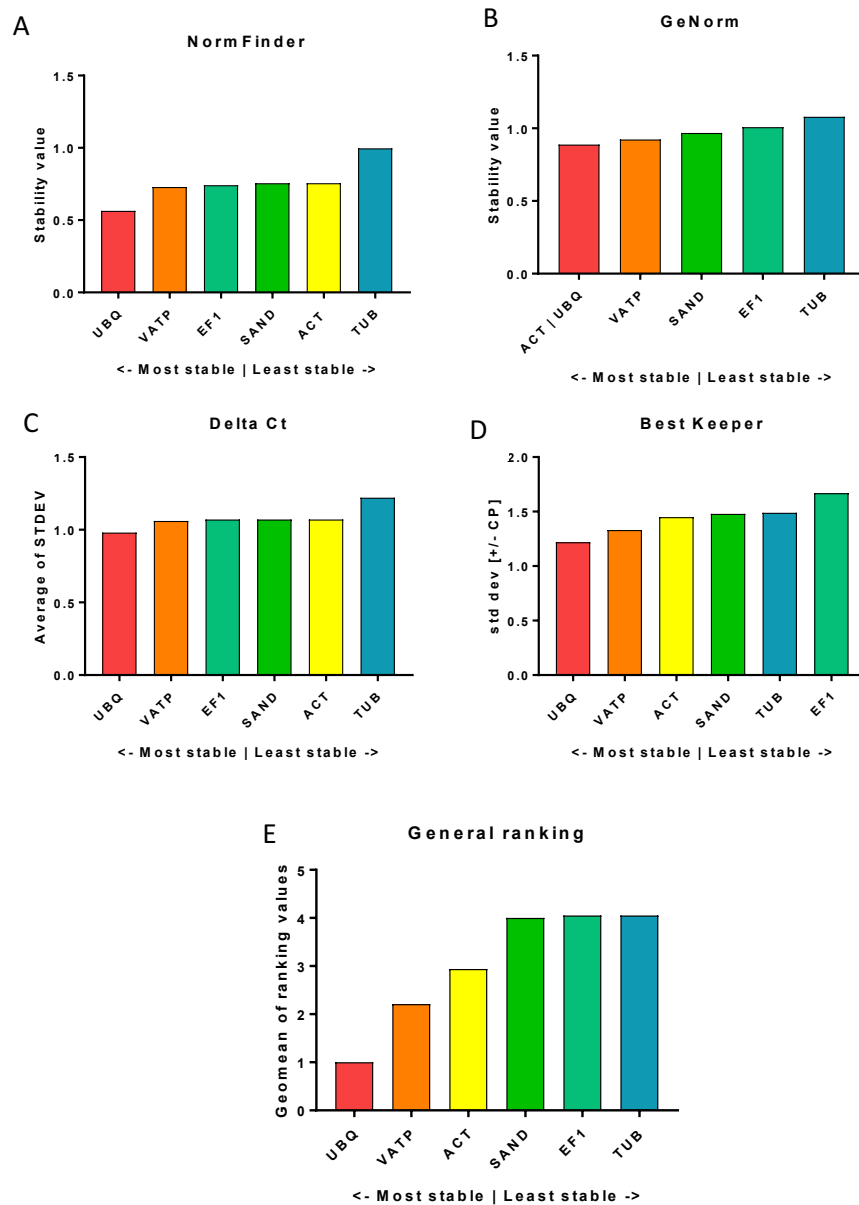


Figure 3.14 : Stabilité d'expression des gènes de référence. Classement des gènes de référence selon leur stabilité après traitement au DEX et après traitement contrôle. Les Ct ont été déterminés par qPCR pour chacun des gènes testés. (A) Classement de stabilité d'expression des gènes selon l'algorithme de NormFinder. (B) Classement de stabilité d'expression des gènes selon l'algorithme de GeNorm. (C) Classement de stabilité d'expression des gènes selon la méthode du Delta Ct. (D) Classement de stabilité d'expression des gènes selon l'algorithme de BestKeeper. (E) Classement général de stabilité d'expression des gènes après compilation des résultats obtenus grâce à l'algorithme de RefFinder.

dans toutes les conditions (Figure 3.14). Ce classement est effectué grâce à *RefFinder*, un outil

développé pour l'évaluation et le criblage de gènes de référence. Cet outil intègre la plupart des programmes d'évaluation de stabilité disponibles tels que : *geNorm*, *Normfinder*, *BestKeeper*, et le technique du *Delta Ct*. La compilation des résultats obtenus par tous les algorithmes permet des conclusions robustes. À la suite de ces analyses, le gène codant pour l'Ubiquitine, *UQB* et celui codant pour l'ATPase de type V, *VATP* semblent être les plus stables dans notre contexte (Figure 3.14) Ces deux gènes seront donc utilisés lors de l'analyse d'expression des homologues de *NbBIG*, *NbTOR* et *NbCIPK5* en condition de défense

3.3.3 Immunoprécipitation de l'ARN de *N. benthamiana*

Dans le but d'isoler les ARNm liés aux ribosomes d'*A. thaliana* en conditions de défense et contrôle, ces derniers sont immunoprécipités après traitement au DEX ou au $MgCl_2$. L'immunoprécipitation est rendue possible grâce à des billes anti-FLAG (section 2.7.1). Elle est suivie d'une extraction d'ARNm, au même moment, une fraction des échantillons destinés à l'immunoprécipitation est mise de côté pour permettre l'extraction d'ARNm totaux (section 2.7.2). La qualité de ces ARNm est évaluée par migration sur gel d'agarose 1.5 %, la présence de deux bandes intactes indique que l'ARNm est non dégradé (Figure 3.15). Le gel n'étant pas dénaturant, les deux bandes représentent les deux sous-unités ribosomales. L'ARNm extrait étant de qualité suffisante et en quantité acceptable (résultats non présentés), il est possible de

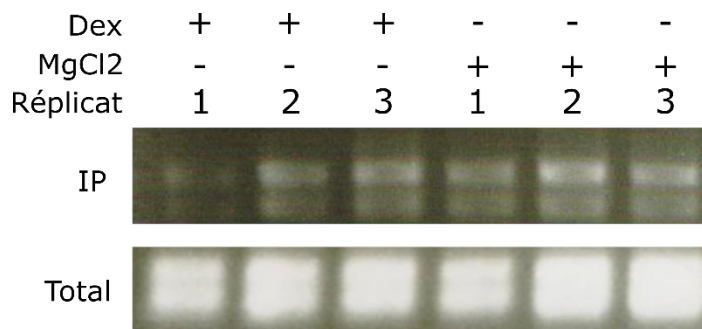


Figure 3.15 : Migration d'ARN sur gel d'agarose. ARN isolé par immunoprécipitation (IP) et ARN total isolé par extraction phénol-chloroforme (Total), après traitement au DEX et traitement contrôle ($MgCl_2$).

procéder à la production de l'ADNc par RT-PCR, puis à l'analyse d'expression de *NbTOR*, *NbCIPK5*, et *NbBIG*.

3.3.4 Expression de gènes candidats chez *Nicotiana benthamiana*

Après avoir identifié les homologues des gènes candidats chez *N. benthamiana*, déterminé quels sont les gènes de référence les plus stables dans ce contexte spécifique, validé la qualité des ARNm extraits et les avoirs convertis en ADNc, il est maintenant possible de procéder à la quantification de l'expression relative de *BIG*, *TOR* et *CIPK5*. Comparer la quantité relative d'ARNm en traduction et la quantité d'ARNm total après induction d'une réponse de type NB-LRR (DEX), ou en condition contrôle, va permettre d'évaluer si la régulation de la traduction en défense est conservée à travers les espèces.

Les analyses d'expression relative ne démontrent malheureusement pas de différence significative entre l'ARNm en traduction (lié aux ribosomes) et l'ARNm total aussi bien après traitement au DEX ou au MgCl₂, pour *BIG* et *TOR* (Figure 3.16). Même si l'écart n'est pas significatif, il est intéressant de noter que l'expression de *TOR* et *BIG* semble augmenter suite à l'activation de Rpm1. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus chez *A. thaliana* dans le cas de *BIG* dont le transcrit est induit en défense (Tableau 1). Par contre, cette remarque n'est pas valable pour *TOR*, puisque le transcrit de ce dernier est réprimé en défense (Tableau 1). À l'image de *TOR* et *BIG*, *CIPK5* ne présente pas de différence significative entre la quantité d'ARNm en traduction et total après induction d'une réponse de type NB-LRR.

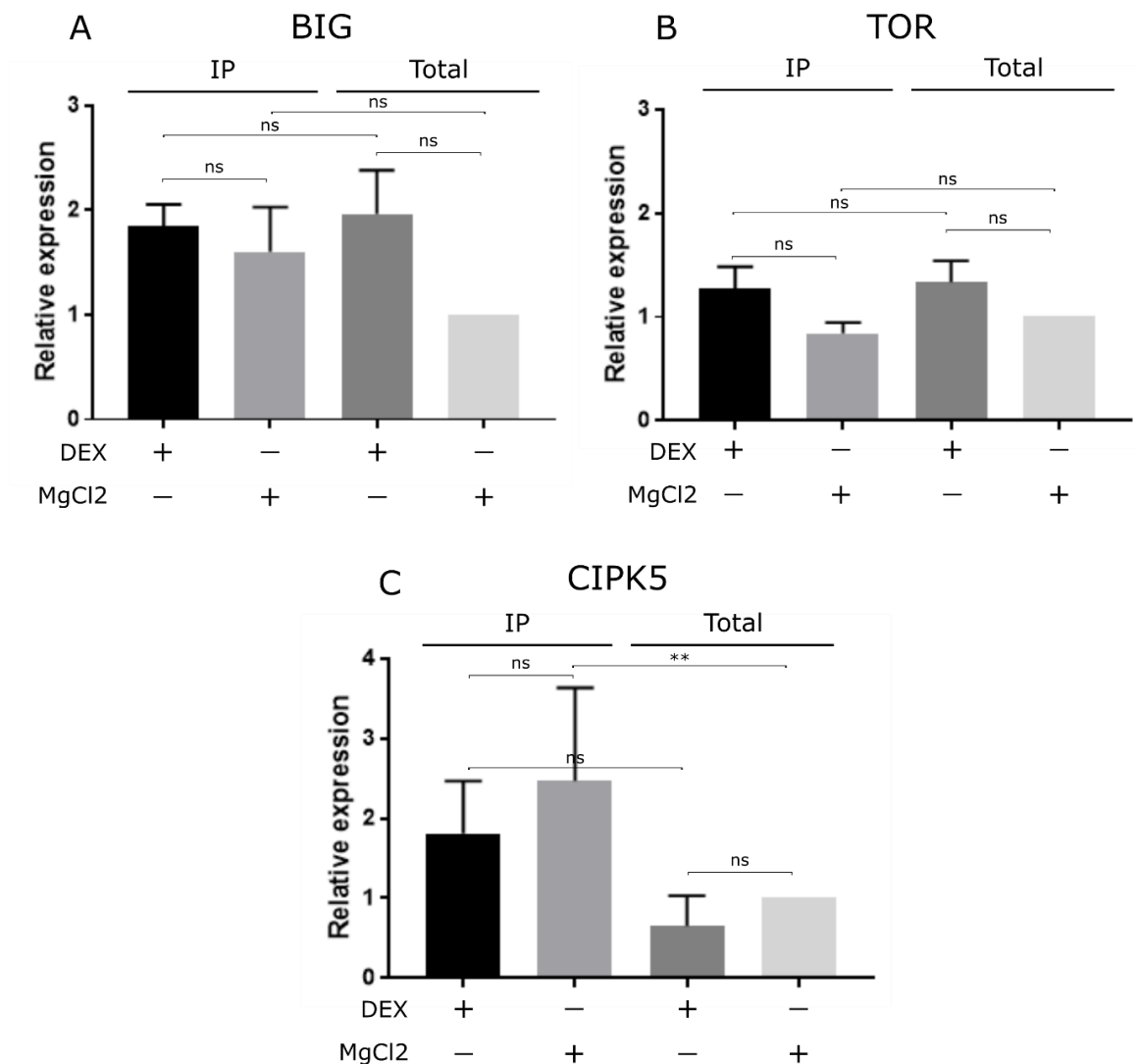


Figure 3.16 : Expression relative de gènes candidats en condition de défense. Quantification de l'expression relative de (A) BIG, (B) TOR et (C) CIPK5 chez *N. benthamiana* en réponse à AvrRpm1, sur des ARNm liés aux ribosomes (IP) ou totaux (total). Les C_t de chaque échantillon et pour chaque réaction sont convertis en expression relative (ER). Pour cela, une normalisation est d'abord effectuée sur les C_t obtenues pour chaque réaction, avec les C_t obtenues pour la condition témoin; l'extrait totale d'ARN des plantes traitées au $MgCl_2$ C_t de l'échantillon testé $1 - C_t$ Témoin = ΔC_t , C_t du gène de référence - C_t Témoin = ΔC_{tref} . La seconde étape consiste à déterminer l'expression relative en prenant en compte l'efficacité des amorces(EA) $ER = EA^{(\Delta C_t)} / EA_{ref}^{(\Delta C_{tref})}$. L'analyse statistique se fait par une ANOVA à comparaison multiple *** $P < 0,001$, chaque valeur acquise après traitement au DEX est comparée aux valeurs après traitement témoin. Les moyennes ont été calculées avec deux reliquats biologiques indépendants et les barres d'erreurs représentent l'erreur-type.

Même s'il est impossible d'observer un écart représentatif, le patron d'expression de *CIPK5* chez *N. benthamiana* semble suggérer que l'expression de ce gène est réprimée après traitement au DEX (Figure 3.16) ce qui est en accord avec les résultats du traductome de défense d'*A. thaliana*.

Les résultats obtenus dans cette analyse pointent vers la déduction que la régulation post-transcriptionnelle de *BIG*, *TOR* et *CIPK5* observée chez *A. thaliana* en réponse à AvrRpm1 n'est pas conservée chez *N. benthamiana*. Cependant, il est impossible de conclure car les expériences de PCR quantitative menées ici n'ont été répétées que deux fois et méritent donc un dernier réplicat pour pouvoir émettre une conclusion ferme. Ce dernier réplicat n'a pas été réalisé par manque de temps.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'analyse du traductome de défense d'*A. thaliana* par Meteignier *et al.*, (2017) a permis d'affirmer que la traduction est un processus très régulé et que sa régulation semble nécessaire à l'établissement d'une réponse de défense de type NB-LRR efficace. De plus, cette étude met en lumière de nombreux gènes dont les transcrits sont régulés spécifiquement au niveau de la traduction, c'est-à-dire possédant une efficacité de traduction découplée de leur transcription. Parmi ces gènes, on compte des candidats connus pour être impliqués dans la résistance aux chocs abiotiques et dans la résistance aux stress biotiques. Cependant, plusieurs d'entre eux n'ont encore jamais été impliqués dans quelconque mécanisme de résistance végétale, voire même n'ont encore jamais été caractérisés jusqu'à maintenant.

Les gènes candidats identifiés dans cette étude (Tableau 1) sont donc régulés strictement au niveau de la traduction et cette régulation est alors nécessaire à la réponse de défense induite par RPM1 (Meteignier *et al.*, 2017). L'impact de ces candidats en tant que tels sur la résistance de type NB-LRR, n'a pas encore été investigué. Dans cette optique, des plants mutants (T-DNA) pour ces gènes candidats d'*A. thaliana* ont été confrontés à l'infection par la bactérie *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato*, l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* et le virus *Plantago asiatica mosaic virus*. Ainsi leur niveau de résistance ou susceptibilité à chaque agent phytopathogène peut être mesuré, cette mesure reflète alors l'importance de chaque candidat testé dans la résistance végétale.

Le gène *BIG* identifié comme étant inhibé au niveau de la traduction en condition normale et induit en défense, semble requis à l'établissement d'une réponse de défense efficace contre *Pto* DC3000 (Figure 3.1). Ajouté à ça, *BIG* est aussi nécessaire à la résistance contre *H. a. Noco2*. La souche *Noco2* d'*H. a.* étant virulente lorsque propagé sur l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*, la

susceptibilité accentuée du plant *big* à Noco2 comparé à Col-0 sous-entend que *BIG* est non seulement indispensable à la réponse ETI, mais aussi à la PTI. La protéine codée par ce gène a une longueur d'environ 5000 acides aminés et possède des similarités avec la *Cassolin* de la drosophile (Gil *et al.*, 2001). Elle a fait l'objet de nombreuses études et est à présent connue pour être requise dans le transport de l'auxine (Gil *et al.*, 2001), et donc la croissance d'organes chez *A. thaliana* (Guo *et al.*, 2013). En effet, deux mutants pour les allèles *DOCI* (*DARK OVEREXPRESSION OF CAB 1*) et *TIR3* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 3*) chez la plante modèle présentent respectivement une expression altérée de gènes de régulation de la lumière (Ruegger *et al.*, 1997) et un transport de l'auxine réduit dans les inflorescences (Li *et al.*, 1994). Ces deux allèles sont positionnés dans le locus *BIG* (Luschnig, 2001). Ces résultats suggèrent qu'un rôle dans le système immunitaire végétal peut être octroyé au transport de l'auxine. Cette observation n'est pas complètement nouvelle, en effet plusieurs phytohormones sont déjà connues pour être impliquées dans la réponse de défense des plantes. C'est le cas de l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène, etc (Knogge *et al.*, 2009). Il a aussi été démontré que l'auxine influencerait la résistance d'*A. thaliana* à *P. syringae*. Navarro *et al.*, (2006) ont montré que le miR393 inhibe la traduction de *TIR1* (*Transport Inhibitor Response 1*), *AFB2* et *AFB3* (*Auxin signaling F-Box proteins 2* et *3* respectivement) après induction de la PTI. Cette équipe a aussi observé que le phénomène est nécessaire à la résistance contre la bactérie. Une autre étude a aussi renforcé le rôle antagoniste de l'auxine dans la réponse à l'infection. Le gène *GH3.5*, responsable en partie de la synthèse d'une des formes de l'auxine, serait manipulé lors de l'invasion avec *P. syringae* par la bactérie pour lever la répression de production de l'hormone (Zhang *et al.*, 2007). La production d'auxine est donc néfaste aux systèmes de défense des plantes. AvrRpt2 par exemple, « force » la cellule végétale à produire plus d'auxine (Navarro *et al.*, 2006), ou encore *Ralstonia solanacearum*, elle, synthétise directement de l'auxine durant une infection (Valls *et al.*, 2006). La manipulation de production d'auxine chez les plantes semble donc être une stratégie d'infection efficace employée par certains phytopathogènes. Le rôle exact de la protéine *BIG* dans le transport polaire de l'auxine est encore à l'état d'hypothèse. Ce dernier pourrait être nécessaire à la réception de protéine transporteur d'auxine, possiblement à travers l'inhibition du mécanisme

d'endocytose. Cependant, l'action de BIG ne semble pas être spécifique à l'auxine et pourrait être associée à d'autres hormones (Kanyuka *et al.*, 2003). Toutes ces observations supportent la nature pléiotropique de BIG. Même si son impact est indéniable, son rôle exact dans la résistance des végétaux reste encore à être caractérisé.

Parmi les gènes candidats avec un phénotype intéressant, on compte notamment, AT1G07280, dont la traduction est négativement régulée après activation de RPM1 (Tableau 1). Le plant mutant *tpr* n'est pas requis pour la résistance contre *Pto* DC3000 AvrRpm1 (Figure 3.1), mais présente cependant un gain de susceptibilité durant l'interaction avec le pathogène virulent *H. a. Noco2* (Figure 3.2). Le gène AT1G07280, renommé ici *TPR* car il code pour une protéine avec un domaine *Tetratricopeptide repeat-like* (*TIGR* et *GenPept databases*), n'a jusqu'à maintenant jamais été caractérisé. Les domaines TPR sont des modules d'interaction protéine-protéine qui facilitent les interactions spécifiques (Lamb *et al.*, 1995). Ils sont retrouvés chez de nombreuses protéines, n'ayant pas forcément d'homologie fonctionnelle (Blatch et Lässle, 1999). Ces motifs répétés de 34 aa peuvent posséder différents nombres de répétitions en tandem, soit de 3 à 16 (Blatch et Lässle, 1999). Le cas de *TPR* dans cette étude est particulier : selon les données du traductome, il est réprimé après induction de RPM1, ce qui suggère à première vue que ce gène est un régulateur négatif de la résistance. Mais le mutant *tpr*, lui, arbore un phénotype de susceptibilité lorsque confronté à *H. a. Noco2*. Il est difficile de conclure quant au rôle de *TPR* dans la réponse de défense, étant donné le manque d'information sur la protéine encodée par le gène. Cependant, il est possible d'émettre des hypothèses pouvant expliquer le comportement du mutant. (1) *TPR* pourrait être requis exclusivement pour la réponse de défense basale des plantes et serait néfaste à la seconde couche de défense enclenchée par les NB-LRR. C'est le cas de *ARP6*, composant du complexe de remodelage de la chromatine SWR1 et de *HTA9* et *HTA11* codant pour le variant d'histone H2A.Z. Les mutants d'*A. thaliana arp6* et *hta9hta11* présentent une activation accrue des MAPK par flg22 et une inhibition de HR et de résistance de type ETI (Cheng *et al.*, 2013). Ces deux mutants sont phénotypiquement similaires à des plants exposés à haute température. Cette observation pointe vers l'idée que la PTI est plus efficace à température ambiante tandis que la ETI l'est à

température plus élevée. *tpr* ne présente pas le dit phénotype, mais puisqu'encore très peu d'informations sont disponibles sur le gène, cette hypothèse reste plausible. (2) *TPR* ferait partie d'une boucle de rétro-inhibition, ce qui expliquerait le phénotype de *tpr* face à *H. a.* malgré la répression de la traduction de son transcrit. Cette hypothèse a déjà été émise pour d'autres protéines et facteurs de transcription, dont la rétro-inhibition permettrait de restreindre la durée et l'amplitude de la réponse immunitaire des plantes, cette dernière étant énergivore (Campos *et al.*, 2014; Eulgem et Imre, 2007; D. Lu *et al.*, 2011). (3) *TPR* pourrait être nécessaire seulement à la résistance contre *H. a.* Noco 2. Cet oomycète est un biotrophe obligatoire, c'est-à-dire que la colonisation de son hôte est nécessaire à sa survie (Asai *et al.*, 2015). Ce cycle de vie particulier implique des méthodes d'infection différentes. À l'instar de *Pto* DC3000 qui disposent d'effecteurs robustes, *H. a.*, lui, a tendance à produire des effecteurs à plus faible impact, mais en exprime en plus grand nombre dans le but de maintenir son hôte en vie, tout en inhibant sa réponse de défense (Coates et Beynon, 2010). Il est possible que *TPR* soit impliqué dans un processus de résistance spécifique à *H. a.* de manière encore inconnue. La caractérisation de la protéine par spectrométrie de masse par exemple et l'identification de possible interactant de *TPR*, aiderait grandement à une meilleure compréhension quant au rôle de *TPR* dans les systèmes de défenses d'*A. thaliana*. La quantification de l'activation de la PTI et/ou de la ETI sur une lignée transgénique qui surexprime *TPR* en comparaison avec la lignée KO de ce même gène serait une première approche intéressante pour tester ces hypothèses.

lea lui aussi présente le même patron de susceptibilité et résistance que *tpr* à *H. a.* Noco2 et *Pto* DC3000, respectivement (Figures 3.1 et 3.2). Le gène AT4G21020 renommé ici *LEA* code pour une protéine de la famille des *Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins*. Le génome d'*A. thaliana* possède jusqu'à 51 gènes codant pour des protéines de cette famille (Hundertmark et Hinch, 2008). Les principaux traits caractérisant cette famille sont; une séquence de faible complexité, la présence de motifs répétés, des protéines hautement hydrophiles, solubles à haute température et n'adoptant pas de structure définie (Wise et Tunnacliffe, 2004). Ces protéines, de par leur patron d'expression et leur haute hydrophilicité,

ont été associées aux mécanismes de résistance à la dessiccation, mais aussi à la tolérance au changement osmotique, et au stress salin (Cuming, 1999; Y. Liu et Zheng, 2005). L'adaptation à la dessiccation est un processus médié par l'acide abscissique qui semble en plus contrôler la synthèse des protéines LEA (Delseny *et al.*, 2001; Parcy *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1996). Les protéines LEA sont donc impliquées dans divers processus de résistances, mais leurs fonctions précises restent encore élusives. Malgré leur structure et leur localisation précoce communes elles semblent avoir des propriétés fonctionnelles différentes (Alsheikh *et al.*, 2003; Irar *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2005; Thomashow *et al.*, 1998). Très peu d'informations sont disponibles sur la protéine codée par AT4G21020; on sait que sa localisation subcellulaire prédite est au niveau des mitochondries, et qu'elle est exprimée dans les graines (Bies-Ethève *et al.*, 2008). De plus, elle semble être exprimée après induction à l'acide abscissique (Bies-Ethève *et al.*, 2008). Le manque d'informations sur cette protéine nous oblige à spéculer. Ainsi, dans la même optique que *TPR*, le patron de susceptibilité de *lea* pourrait être dû au rôle spécifique de *LEA* dans la résistance à *H. a. Noco2*, ou simplement au mécanisme de défense basale. Il est aussi important de noter que le processus d'infection à *H. a.* nécessite un traitement au froid. Ce traitement introduit la possibilité que *LEA* exerce une fonction dans la résistance au froid, les protéines LEA en général étant impliquées dans la résistance au stress abiotique. Malgré tout, la caractérisation spécifique de la protéine codée par AT4G21020 est essentielle à l'affirmation ou l'infirmer de ces dernières hypothèses.

Le transcrit du gène *RRTF1* (*REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1*), lui, exhibe une efficacité de traduction presque nulle en condition contrôle et positive en défense. En d'autres mots, la traduction de ce transcrit est induite en condition de défense (Tableau 1). Les résultats obtenus lors des diverses infections indiquent que *RRTF1* est requis pour l'établissement de la résistance induite par RPM1. Contrairement à *LEA* et *TPR*, *RRTF1* a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de lier le rôle de *RRTF1* à la résistance d'*A. thaliana*. *RRTF1* est un composant de la voie de signalisation rédox incluant notamment WRKY33 (Khandelwal *et al.*, 2008), son expression est rapidement induite par diverses espèces réactives à l'oxygène (ROS) et par des signaux biotiques et abiotiques générant des ROS. Matsuo *et al.*,

(2015) ont démontré que la surexpression de *RRTF1* entraîne l'accumulation de ROS dans les racines et pousses, en plus d'accentuer la sensibilité de la plante à *Alternaria brassicae*. La surexpression constitutive et à long terme de *RRTF1* dans tous les tissus de la plante l'affaiblit, la rendant alors susceptible aux stress biotique et abiotique (Matsuo *et al.*, 2015). La protéine RRTF1 permettrait alors d'induire l'expression de ROS en cas d'infection, d'où la nécessité d'induire la traduction de son transcrite après détection d'un NB-LRR. Mais, sa surexpression est nocive pour les plants puisque l'accumulation de ROS est elle-même nocive pour les végétaux. En plus de confirmer le rôle important de RRTF1 dans la résistance des végétaux, cette présente étude a permis d'élargir sa fonction à la réponse de type NB-LRR. Cependant, il aurait été intéressant de tester la susceptibilité du mutant *rrtf1* à *H. a. Noco2*, mais ce dernier possédait un taux de germination très faible, ce qui a limité les essais d'infections à *Pto* DC3000.

CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase2 ou *CCT2* code pour une protéine responsable de la biosynthèse de phosphatidylcholine (PC) (Craddock *et al.*, 2015; Inatsugi *et al.*, 2009; Inatsugi *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2014). En plus d'être retrouvée dans la membrane plasmique, la PC est aussi un composant de la plupart des compartiments cellulaires, excepté les plastes. Elle sert aussi de précurseur métabolique à de nombreux glycérolipides constituant des membranes plastidiques (Ohlrogge et Browse, 1995). Dans l'étude de Meteignier *et al.*, (2017), la traduction du transcrite de *CCT2* est induite en condition de défense (Tableau 1). Les résultats obtenus suite aux diverses infections pointent vers la conclusion que *CCT2* est nécessaire à la résistance d'*A. thaliana* aussi bien au niveau basal, que de type NB-LRR. En effet, le mutant *cct2* exhibe une susceptibilité accrue aussi bien à *H. a. Noco2* qu'à *Pto* DC3000 (Figures 3.1 et 3.2). *A. thaliana* possède deux isoformes de CCT, *CCT1* et *CCT2*, dont l'expression est influencée par l'abaissement de la température (Inatsugi *et al.*, 2002). La membrane cellulaire est connue pour s'étendre à basse température. La phosphatidylcholine (PC) étant nécessaire à cette expansion, *CCT2* et *CCT1* sont donc induits lors d'un stress au froid (Inatsugi *et al.*, 2002, 2009). Cependant, le rôle de *CCT2* dans la résistance d'*A. thaliana* n'a encore jamais été élucidé. Il est connu que la manipulation de la membrane plasmique est

une méthode utilisée par différents phytopathogènes pour assurer leur propagation. La formation de l'haustorium par des oomycètes et autres champignons par exemple, entraîne l'expansion de la membrane plasmique, ou encore les symbiosomes de bactéries sous forme de nodules dont la formation et le maintien nécessitent un grand réarrangement de la membrane. L'inverse est aussi vrai, la manipulation de la membrane plasmique est aussi un procédé utilisé par l'hôte pour échapper à l'invasion microbienne. Par exemple, la formation de vésicules permet la sécrétion de protéines de résistance ou d'agents antimicrobiens à l'interface entre l'hôte et le pathogène (décrit dans Leborgne-Castel et Bouhidel, 2014). Il est possible qu'à travers la biosynthèse de PC, *CCT2* permette la formation de vésicules pour le transport de protéines de résistance. Toutefois, il n'est pas impossible que la fonction de *CCT2* dans la défense ne soit pas liée à son rôle dans la production de membrane. En effet, Inatsugi *et al.*, (2009) a montré que chez un mutant *cct2*, la synthèse de PC est comblée par *CCT1*(AT2G32260), or ce dernier ne semble pas être régulé au niveau de la traduction en condition de défense. Cette observation suggère que *CCT2* possède une activité propre, n'ayant pas de lien avec la production de PC. Une étude plus approfondie de l'activité de *CCT2* dans un contexte de défense est nécessaire à la compréhension du rôle de cette protéine dans les divers mécanismes de défense des plantes.

En plus d'identifier des régulateurs positifs de résistance des plantes, ce projet a permis de mettre en lumière des régulateurs négatifs de la réponse de défense d'*A. thaliana*. C'est le cas de *CIPK5* et *TOR*, tous deux ont un niveau de traduction réprimé en condition de défense. Ajouté à ça, les données d'infections indiquent un gain de résistance chez les mutants *cipk5* et *TOR* RNAi, ce qui valide l'effet néfaste de ces deux candidats sur la résistance. *TOR* est une protéine extensivement étudiée. La voie *TOR* permet d'orienter le métabolisme, en fonction des conditions environnementales, vers l'anabolisme ou le catabolisme et ce, à travers la régulation post-transcriptionnelle (Dobrenel *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2011). En effet, dans les cellules animales, *TOR* est connue pour influencer la traduction notamment à travers la phosphorylation de *S6K*, qui *in fine* stimule la traduction des *4E-BP* qui, au contraire, se conclut par l'inhibition de la traduction (Holz *et al.*, 2005; Pause *et al.*, 1994). Malgré les

nombreuses études, la voie TOR est encore peu connue chez les végétaux, de même que son rôle dans leurs mécanismes de défense. Quant à CIPK5 (*CBL-interacting protein kinase 5*), cette protéine fait partie de la famille des *SNF1-related kinases*. Cette famille de protéines comprend notamment SnRK1, qui ressemble de près à SNF1 et aux AMPkinases capables d'inhiber TOR. Elle comprend les sous-groupes SnRK2 et SnRK3 qui sont impliquées dans la résistance aux stress abiotiques (Crozet *et al.*, 2014). Même si l'activité de CIPK5 dans la résistance des plantes n'a jamais été caractérisée, il est juste de penser que son rôle peut être lié à la régulation négative qu'elle pourrait avoir sur TOR. Le rôle de TOR et des CIPK dans la défense d'*A. thaliana* est investigué avec plus de précision par Mathias Cohen, étudiant au laboratoire.

Plusieurs nouveaux acteurs des réponses de défenses de type PTI et ETI, ont été identifiés de par leur efficacité de traduction. Parmi ces candidats, certains possèdent un impact important sur la résistance d'*A. thaliana*, comme l'ont démontré les nombreux résultats d'infections aux trois agents phytopathogènes. En effet, la mutation de gènes tels que *BIG*, *CCT2* ou *RRTF1* a suffi pour compromettre le mécanisme immunitaire de la plante modèle. Cependant, de nombreux gènes identifiés comme étant régulés au niveau de la traduction n'ont démontré aucun effet sur la résistance de l'hôte lorsque mutés. C'est le cas de *TZF1* (AT2G25900), dont le transcrit est réprimé en condition de défense, ou encore de *TCTP* (AT3G16640) dont le transcrit est réprimé en condition témoin, mais non en condition de défense. C'est aussi le cas de *OPS* (AT3G09070) qui, lui, est induit au niveau de la traduction en condition de défense (Meteignier *et al.*, 2017). Tous ces gènes ont certainement un impact sur les mécanismes de résistances d'*A. thaliana*, puisque leur traduction est régulée lors de l'activation de RPM1. Mais cet impact n'est peut-être pas suffisant pour compromettre les voies de défenses de la plante modèle lorsque ces gènes sont individuellement mutés. Même si les essais d'infections n'ont pas permis de valider la fonction de ces gènes, il n'est pas impossible que ces candidats aient tout de même un rôle important dans l'établissement d'un mécanisme de défense stable.

Les régions transcrites, mais non traduites sont ciblées par de nombreuses voies de régulation de la traduction (Abler et Green, 1996; Gallie, 1991; Munroe et Jacobson, 1990). Des analyses bioinformatiques menées par Munusamy *et al.*, (2017) sur les données obtenues à la suite du TRAPseq et RNAseq de Meteignier *et al.*, (2017), ont identifié de nombreux motifs conservés et sites de liaison aux microARN dans les UTR de gènes régulés au niveau de la traduction. À partir des données du traductome, les auteurs définissent un gène régulé au niveau de la traduction comme étant un gène avec un niveau d'abondance différent dans le groupe d'analyse transcriptomique et traductomique. Selon leurs résultats, 19% des candidats régulés au niveau de la traduction possèdent un ou plusieurs uORF dans leur région 5'UTR. En plus des uORF, les auteurs ont aussi identifié jusqu'à 30 sites de liaison aux miRNA chez les candidats toutes conditions confondues. L'équipe du Pr Stromvik a donc bien démontré que les régions 5' et 3' UTR des gènes candidats sont riches en sites de régulation, et pourraient donc être ciblées par une variété de voies de régulation possiblement propres aux systèmes de défense. Cependant, beaucoup de ces données restent à l'état de prédictions et méritent d'être confirmées expérimentalement. C'est pourquoi, le second volet de ce projet avait pour stratégie le clonage des régions transcrites, mais non traduites en 5' et en 3' de certains gènes candidats. L'insertion de ces régions était prévue dans un vecteur qui permet la quantification de l'expression de la luciférase.

Les gènes candidats sélectionnés pour ce volet furent *CIPK5*, *TOR*, *LCR67*, *LEA*, *BIG* et *HBII*. Cependant, seulement les UTR en 5' de *CIPK5* et *TOR* ont été clonées avec succès (Figure 3.8 et 3.9). La région 5'UTR de *CIPK5* semble avoir un effet significatif sur la traduction du gène en aval. En effet, l'expression de la luciférase est plus élevée en présence de l'UTR de *CIPK5* aussi bien en condition normale, qu'après l'activation de RPM1 (Figure 3.11). Il est intéressant de noter que le 5'UTR de *CIPK5* comporte un uORF d'environ 96 pb, il y a donc une grande probabilité qu'il influence la traduction du mORF (Munusamy *et al.*, 2017, Supplementary Tables; Mignone *et al.*, 2002). En effet, l'uORF de *CIPK5* se situe dans un cadre favorable à l'initiation de sa traduction, puisqu'il est entouré d'un consensus de Kozak ('A/G' -3 et 'G' +4). Ainsi, cette petite région codante en amont du codon d'initiation a de forte chance

d'inhiber la traduction de l'ORF principal selon un mécanisme indépendant de la réponse de défense. Ce dit mécanisme n'a pour l'instant pas été déterminé, mais il est possible que la traduction de l'uORF soit inhibée sous l'influence d'un stimulus encore inconnu, mais non lié à RPM1. Il est aussi possible que d'autres motifs de cette région 5'UTR soit à l'origine de l'expression accrue du rapporteur en amont ; la présence d'un consensus de Kozak par exemple, qui est absent dans le vecteur non cloné. Dans tous les cas, l'effet observé n'est pas celui attendu, puisque selon l'étude du traductome, *CIPK5* est inhibé en condition de défense. Il serait intéressant de poursuivre les essais d'expression de la luciférase avec la région 3'UTR de ce même gène pour déterminer si cette dernière est responsable de la répression de sa traduction. De plus, il n'est pas impossible que les deux régions agissent en synergie pour induire le patron de répression observé par Meteignier *et al.*, (2017). Ces suggestions sont aussi valables pour TOR dont la région 5'UTR n'exhibe pas d'effet significatif sur l'expression du rapporteur, mais dont la traduction est inhibée après activation d'une NB-LRR (Figure 3.11). Comme mentionné plus tôt, malgré de nombreuses tentatives, le clonage des UTR de *LCR67*, *LEA*, *BIG* et *HBII* n'a jamais réussi. Ces gènes restent quand même des candidats intéressants de par leur impact sur la résistance d'*A. thaliana* contre divers agents pathogènes, ou de par la différence d'efficacité de traduction qu'ils arborent entre les deux conditions. La poursuite de ces expériences permettrait la caractérisation d'un ou des mécanismes de régulation de la traduction, possiblement spécifique aux mécanismes de défense des plantes.

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

Jusqu'à présent, le traductome d'*A. thaliana* était encore très peu étudié. On sait maintenant que la traduction est fortement affectée lors d'une interaction incompatible avec un agent pathogène. En effet, l'étude menée par Meteignier *et al.*, (2017) a démontré que la traduction de nombreux gènes est soit réprimée soit induite suite à l'activation de la ETI.

Les nombreuses analyses conduites dans ce projet ont permis d'écarter les régions 5'UTR de *CIPK5* et *TOR* comme étant responsables de la régulation de la traduction des gènes en aval. Cependant, il n'est pas impossible que les régions UTR d'autres gènes candidats soit ciblées par un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, les gènes candidats identifiés étant riches en motifs conservés d'après Munusamy *et al.*, (2017). Dans le futur, il serait intéressant d'investiguer l'impact de ces régions sur la traduction des gènes candidats.

De plus, même s'il est impossible d'émettre une conclusion ferme sur la conservation du processus de régulation de la traduction en réponse à l'activation d'une protéine NB-LRR chez *N. benthamiana*, les résultats préliminaires obtenus suggèrent que ce phénomène n'est pas conservé à travers les espèces.

En conclusion, plusieurs de ces gènes candidats identifiés ont un effet considérable dans la réponse de défense aussi bien basale que de type NB-LRR d'*A. thaliana*. C'est ainsi que des régulateurs positifs de l'immunité végétale ont été découverts, tels que *BIG*, *CCT2* et *RRTF1* de même que des régulateurs négatifs comme *TOR* et *CIPK5*. Cependant, certains des candidats arborant une efficacité de traduction très affectée, ne semblent pas avoir d'impact significatif sur la résistance de la plante. Il est possible que la fonction de ces gènes ait un effet sur la défense, mais que la mutation individuelle de ces derniers ne soit pas suffisante pour compromettre les voies de défenses de la plante. La caractérisation complète des gènes candidats permettrait une meilleure compréhension des voies de signalisation menant à la ETI.

BIBLIOGRAPHIE

- Abler, M.L., and Green, P.J. (1996). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32, 63–78.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology* (Elsevier Academic Press).
- Albert, M., and Felix, G. (2010). Chimeric receptors of the *Arabidopsis thaliana* pattern recognition receptors EFR and FLS2. *Plant Signal. Behav.* 5, 1430–1432.
- Ali, S., Magne, M., Chen, S., Cote, O., Stare, B.G., Obradovic, N., Jamshaid, L., Wang, X., Blair, G., and Moffett, P. (2015). Analysis of Putative Apoplastic Effectors from the Nematode, *Globodera rostochiensis*, and Identification of an Expansin-Like Protein That Can Induce and Suppress Host Defenses. *PLoS One* 10, e0115042.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., *et al.* (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301, 653–657.
- Alsheikh, M.K., Heyen, B.J., and Randall, S.K. (2003). Ion Binding Properties of the Dehydrin ERD14 Are Dependent upon Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 40882–40889.
- Aoyama, T., and Chua, N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11, 605–612.
- Asai, S., Shirasu, K., and Jones, J. (2015). *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Downy Mildew) infection Assay in *Arabidopsis*. *BIO-PROTOCOL* 5.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nat.* 415.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.

- Beauchclair, L., Yu, A., and Bouché, N. (2010). MicroRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62, 454–462.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D.A., Mackey, D., and Dangl, J.L. (2004). *Arabidopsis* RIN4 Negatively Regulates Disease Resistance Mediated by RPS2 and RPM1 Downstream or Independent of the NDR1 Signal Modulator and Is Not Required for the Virulence Functions of Bacterial Type III Effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* 16, 2822–2835.
- Bhattacharjee, S., Zamora, A., Azhar, M.T., Sacco, M.A., Lambert, L.H., and Moffett, P. (2009). Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant J.* 58, 940–951.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., and Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 67, 107–124.
- Van der Biezen, E.A., Jones, J.D., and Appels, R. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23, 454–456.
- Van der Biezen, E.A., and Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr. Biol.* 8, R226-7.
- Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* 8, 521–539.
- Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* 21, 932–939.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.

- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464, 418–422.
- Brosseau, C., El Oirdi, M., Adurogbangba, A., Ma, X., and Moffett, P. (2016). Antiviral Defense Involves AGO4 in an Arabidopsis –Potexvirus Interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29, 878–888.
- Campos, M.L., Kang, J.-H., and Howe, G.A. (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *J. Chem. Ecol.* 40, 657–675.
- Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S.P. (2008). Chloroplastic Protein NRIP1 Mediates Innate Immune Receptor Recognition of a Viral Effector. *Cell* 144, 449–462.
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., et al. (2013). The Rice Resistance Protein Pair RGA4/RGA5 Recognizes the Magnaporthe oryzae Effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by Direct Binding. *Plant Cell Online* 25.
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., and Dodds, P.N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the integrated decoy hypothesis. *Front. Plant Sci.* 5, 1–10.
- Chang, K.S., Lee, S.H., Hwang, S.B., and Park, K.Y. (2000). Characterization and translational regulation of the arginine decarboxylase gene in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant J.* 24, 45–56.
- Cheng, C., Gao, X., Feng, B., Sheen, J., Shan, L., and He, P. (2013). Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nat. Commun.* 4, 1–9.
- Cheng, W., Munkvold, K.R., Gao, H., Mathieu, J., Schwizer, S., Wang, S., Yan, Y., Wang, J., Martin, G.B., Chai, J., et al. (2011). Structural Analysis of *Pseudomonas syringae* AvrPtoB Bound to Host BAK1 Reveals Two Similar Kinase-Interacting Domains in a Type

III Effector. *Cell Host Microbe* 10, 616–626.

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497–500.

Coates, M.E., and Beynon, J.L. (2010). *Hyaloperonospora arabidopsidis* as a Pathogen Model. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 329–345.

Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L., and Epple, P. (2010). Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science* 330, 1393–1397.

Coll, N.S., Epple, P., and Dangl, J.L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 18, 1247–1256.

Collier, S.M., and Moffett, P. (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci.* 14, 521–529.

Collier, S.M., Hamel, L.-P., and Moffett, P. (2011). Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24, 918–931.

Combier, J.P., de Billy, F., Gamas, P., Niebel, A., and Rivas, S. (2008). Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev.* 22, 1549–1559.

Craddock, C.P., Adams, N., Bryant, F.M., Kurup, S., and Eastmond, P.J. (2015). PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHOHYDROLASE Regulates Phosphatidylcholine Biosynthesis in Arabidopsis by Phosphatidic Acid-Mediated Activation of CTP:PHOSPHOCHOLINE CYTIDYLYLTRANSFERASE Activity. *Plant Cell* 27, 1251–1264.

Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C.A., and Baena-Gonzalez, E. (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein

kinases. *Front. Plant Sci.* *5*, 1–17.

Cuming, A.C. (1999). LEA Proteins. In *Seed Proteins*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 753–780.

Cuppels, D.A. (1986). Generation and Characterization of Tn5 Insertion Mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* *51*, 323–327.

Damiani, R.D., Wessler, S.R., and Wessler, S.R. (1993). An upstream open reading frame represses expression of Lc, a member of the R/B family of maize transcriptional activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8244–8248.

Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* *411*, 826–833.

Couto, D., and Zipfel C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 537–552.

Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S.T., Li, D., and Staskawicz, B.J. (2005). Molecular Basis for the RIN4 Negative Regulation of RPS2 Disease Resistance. *Plant Cell Online* *17*.

Delseny, M., Bies-Etheve, N., Carles, C., Hull, G., Vicent, C., Raynal, M., Grellet, F., and Aspart, L. (2001). Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *J. Plant Physiol.* *158*, 419–427.

Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaï, M., Bedu, M., Robaglia, C., and Meyer, C. (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* *8*, 864–870.

Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8024–8029.

Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., and Meyer, C.

- (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annu. Rev. Plant Biol* 67, 261–285.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., Ellis, J.G., and Staskawicz, B.J. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *PNAS* 103, 8888–8893.
- Dong, P., Xiong, F., Que, Y., Wang, K., Yu, L., Li, Z., and Ren, M. (2015). Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 6, 677.
- Eitas, T.K., and Dangl, J.L. (2010). NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 472–477.
- Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Luck, J.E., and Dodds, P.N. (1999). Identification of Regions in Alleles of the Flax Rust Resistance Gene L That Determine Differences in Gene-for-Gene Specificity. *Plant Cell* 11, 495–506.
- Eulgem, T., and Imre, Es. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 366–371.
- Freire, M.A. (2005). Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the β subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene* 345, 271–277.
- Gallie, D.R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* 5, 2108–2116.
- Gallie, D.R., and Browning, K.S. (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 36951–36960.
- Gao, Z., Chung, E.-H., Eitas, T.K., and Dangl, J.L. (2011). Plant intracellular innate immune

receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7619–7624.

Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K.C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M., and Chory, J. (2001). BIG: A callosin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* *15*, 1985–1997.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* *43*, 205–227.

Guerra-Peraza, O., de Tapia, M., Hohn, T., and Hemmings-Mieszczak, M. (2000). Interaction of the cauliflower mosaic virus coat protein with the pregenomic RNA leader. *J. Virol.* *74*, 2067–2072.

Guo, X., Lu, W., Ma, Y., Qin, Q., and Hou, S. (2013). The BIG gene is required for auxin-mediated organ growth in *Arabidopsis*. *Planta* *237*, 1135–1147.

Gust, A.A., and Felix, G. (2014). Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* *21*, 104–111.

Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* *14*, 5701–5709.

Hanfrey, C., Elliott, K.A., Franceschetti, M., Mayer, M.J., Illingworth, C., and Michael, A.J. (2005). A Dual Upstream Open Reading Frame-based Autoregulatory Circuit Controlling Polyamine-responsive Translation. *J. Biol. Chem.* *280*, 39229–39237.

Hayden, C.A., and Jorgensen, R.A. (2007). Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in *Arabidopsis* and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. *BMC Biol.* *5*, 32.

Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *PNAS* *104*, 12217–12222.

- Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events. *Cell* 123, 569–580.
- Van Der Hoorn, R.A.L., and Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plan Cell* 20, 2009–2017.
- Hundertmark, M., and Hinch, D.K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118.
- Inatsugi, R., Nakamura, M., and Nishida, I. (2002). Phosphatidylcholine Biosynthesis at Low Temperature: Differential Expression of CTP:Phosphorylcholine Cytidylyltransferase Isogenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43, 1342–1350.
- Inatsugi, R., Kawai, H., Yamaoka, Y., Yu, Y., Sekiguchi, A., Nakamura, M., and Nishida, I. (2009). Isozyme-Specific Modes of Activation of CTP:Phosphorylcholine Cytidylyltransferase in *Arabidopsis thaliana* at Low Temperature. *Plant Cell Physiol.* 50, 1727–1735.
- Irar, S., Oliveira, E., Pagès, M., and Goday, A. (2006). Towards the identification of late-embryogenic-abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS. *Proteomics* 6, S175–S185.
- Jackson, R.J., T Hellen, C.U., and Pestova, T. V (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000a). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004–4014.
- Jin, Y., Chen, Z., Liu, X., and Zhou, X. (2013). Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. *Methods Mol. Biol.* 936, 117–127.
- Jones, A.M.E., Thomas, V., Truman, B., Lilley, K., Mansfield, J., and Grant, M. (2004). Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge:

differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry* 65, 1805–1816.

Jones, A.M.E., Thomas, V., Bennett, M.H., Mansfield, J., and Grant, M. (2006).

Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 142, 1603–1620.

Jorgensen, R.A., and Dorantes-Acosta, A.E. (2012). Conserved Peptide Upstream Open Reading Frames are Associated with Regulatory Genes in Angiosperms. *Front. Plant Sci.* 3, 191.

Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., and Bailey-Serres, J. (2014). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E203-12.

Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J.D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., et al. (2014). Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Mol. Cell* 54, 43–55.

Kanwar, P., Sanyal, S.K., Tokas, I., Yadav, A.K., Pandey, A., Kapoor, S., and Pandey, G.K. (2014). Comprehensive structural, interaction and expression analysis of CBL and CIPK complement during abiotic stresses and development in rice. *Cell Calcium* 56, 81–95.

Kanyuka, K., Praekelt, U., Franklin, K.A., Billingham, O.E., Hooley, R., Whitlam, G.C., and Halliday, K.J. (2003). Mutations in the huge Arabidopsis gene BIG affect a range of hormone and light responses. *Plant J.* 35, 57–70.

Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., and Terauchi, R. (2012). Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *Plant J.* 72, 894–907.

Katagiri, F. (2004). A global view of defense gene expression regulation – a highly interconnected signaling network This review comes from a themed issue on Cell signalling and gene regulation Edited. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 506–511.

- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction. *Arab. B. I.*, e0039.
- Kawaguchi, and Bailey-Serres (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 460–465.
- Keen, N.T. (1990). Gene-For-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24, 447–463.
- Khandelwal, A., Elvitigala, T., Ghosh, B., Quatrano, R.S., Seaton, G., Chow, W.S., Anderson, J.M., and Osmond, C.B. (2008). *Arabidopsis* transcriptome reveals control circuits regulating redox homeostasis and the role of an AP2 transcription factor. *Plant Physiol.* 148, 2050–2058.
- Kiedrowski, S., Kawalleck, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E., and Dangl, J.L. (1992). Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus. *EMBO J.* 11, 4677–4684.
- Kim, B.-H., Cai, X., Vaughn, J.N., and von Arnim, A.G. (2007). On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. *Genome Biol.* 8, R60.
- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L. (2005a). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6496–6501.
- Kim, M.G., Da Cunha, L., Mcfall, A.J., Belkhadir, Y., Debroy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005b). Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis* Cellular and Molecular Biology 3 Program in Plant Molecular Biology and Biotechnology Program in Molecular Cellular and Developmental Biology Room 306C Kottman Hall. *Cell* 121, 749–759.
- Kimball, S.R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 25–29.

- Knogge, W., Lee, J., Rosahl, S., and Scheel, D. (2009). Signal Perception and Transduction in Plants. In *The Mycota*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 337–361.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., and Yoshioka, H. (2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19, 1065–1080.
- Kozak, M. (1987). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3438–3445.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299, 1–34.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12, 206–212.
- Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pélessier, M.-N., Espagnol, M.-C., Robaglia, C., Deragon, J.-M., and Pélessier, T. (2008). Arabidopsis eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biol.* 8, 134.
- Laluk, K., Abuqamar, S., and Mengiste, T. (2011). The Arabidopsis mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance. *Plant Physiol.* 156, 2053–2068.
- Lamb, C.J., Rvals, J.A., Ward, E.R., and Dixon, R.A. (1993). Emerging Strategies for Enhancing Crop Resistance to Microbial Pathogens. *Biotechnol. Agric.* 45–60.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995). Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* 20, 257–259.
- Lázaro-Mixteco, P.E., and Dinkova, T.D. (2012). Identification of Proteins from Cap-Binding Complexes by Mass Spectrometry During Maize (*Zea mays* L.) Germination. *Chem. Soc. J. Mex. Chem. Soc* 56, 36–50.
- Le, H., Tanguay, R.L., Balasta, M.L., Wei, C.C., Browning, K.S., Metz, A.M., Goss, D.J.,

- and Gallie, D.R. (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 272, 16247–16255.
- Lee, J., Eschen-Lippold, L., Lassowskat, I., Böttcher, C., and Scheel, D. (2015). Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Front. Plant Sci.* 6, 1–11.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambrost, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-4*. *Cell* 75, 843–854.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787–798.
- Li, H.M., Altschmied, L., and Chory, J. (1994). *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes Dev.* 8, 339–349.
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X., Wang, Y., et al. (2014). The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329–338.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., et al. (2013). MicroRNAs Inhibit the Translation of Target mRNAs on the Endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* 153, 562–574.
- Liao, P., Chen, Q.-F., and Chye, M.-L. (2014). Transgenic *Arabidopsis* Flowers Overexpressing Acyl-CoA-Binding Protein ACBP6 are Freezing Tolerant. *Plant Cell Physiol.* 55, 1055–1071.
- Lilly, S.T., Drummond, R.S.M., Pearson, M.N., and MacDiarmid, R.M. (2011). Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts from Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 294–304.
- Liu, Y., and Zheng, Y. (2005). PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 325–332.

- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., Zhang, Y., Goodin, M., Zaitlin, D., Naidu, R., Lommel, S., et al. (2012). Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. *PLoS One* 7, e46451.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.-J.D., Coaker, G., Jones, J.D., Felix, G., Boller, T., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., et al. (2011). A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* 9, 137–146.
- Liu, Q., Feng, Y., and Zhu, Z. (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct. Integr. Genomics* 9, 277–286.
- Liu, X., Kørner, C.J., Hajdu, D., Guo, T., Ramonell, K.M., Argueso, C.T., and Pajerowska-Mukhtar, K.M. (2015). *ARABIDOPSIS THALIANA* AtGCN2 KINASE IS INVOLVED IN DISEASE RESISTANCE AGAINST PATHOGENS WITH DIVERSE LIFE STYLES. *Int. J. Phytopathol.* 4, 93–104.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 496–501.
- Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T.P., He, P., and Shan, L. (2011). Direct Ubiquitination of Pattern Recognition Receptor FLS2 Attenuates Plant Innate Immunity. *Science* (80-.). 332, 1439–1442.
- Luschnig, C. (2001). Auxin transport: Why plants like to think BIG. *Curr. Biol.* 11, 831–833.
- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., and Verma, D.P.S. (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18, 477–490.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development:

importance of pairing to the microRNA 5. *EMBO J.* 23, 3356–3364.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell* 3, 707–716.

Matsuo, M., Johnson, J.M., Hieno, A., Tokizawa, M., Nomoto, M., Tada, Y., Godfrey, R., Obokata, J., Sherameti, I., Yamamoto, Y.Y., et al. (2015). High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 Levels Result in Accumulation of Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana* Shoots and Roots. *Mol. Plant* 8, 1253–1273.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. (2002). Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6422–6427.

Meteignier, L.-V., Zhou, J., Cohen, M., Bhattacharjee, S., Brosseau, C., Caamal Chan, M.G., Robatzek, S., and Moffett, P. (2016). NB-LRR signaling induces translational repression of viral transcripts and the formation of RNA processing bodies through mechanisms differing from those activated by UV stress and RNAi. *J. Exp. Bot.* 67, 2353–2366.

Meteignier, L.-V., El Oirdi, M., Cohen, M., Barff, T., Matteau, D., Lucier, J.-F., Rodrigue, S., Jacques, P.-E., Yoshioka, K., and Moffett, P. (2017). Translatome analysis of an NB-LRR immune response identifies important contributors to plant immunity in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., and Young, N.D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20, 317–332.

Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 3, REVIEWS0004.

Miyoshi, T., Ito, K., Murakami, R., and Uchiumi, T. (2016). Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat. Commun.* 7,

11846.

Moeller, J.R., Moscou, M.J., Bancroft, T., Skadsen, R.W., Wise, R.P., and Whitham, S.A. (2012). Differential accumulation of host mRNAs on polyribosomes during obligate pathogen-plant interactions. *Mol. Biosyst.* *8*, 2153–2165.

Mohammad, M.P., Munzarová Pondelícková, V., Zeman, J., Gunišová, S., and Valášek, L.S. (2017). In vivo evidence that eIF3 stays bound to ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to promote reinitiation. *Nucleic Acids Res.* *45*, 2658–2674.

Mucyn, T.S., Clemente, A., Andriotis, V.M.E., Balmuth, A.L., Oldroyd, G.E.D., Staskawicz, B.J., and Rathjen, J.P. (2006). The Tomato NBARC-LRR Protein Prf Interacts with Pto Kinase in Vivo to Regulate Specific Plant Immunity. *Plant Cell* *18*, 2792–2806.

Munroe, D., and Jacobson, A. (1990). mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 3441–3455.

Munusamy, P., Zolotarov, Y., Meteignier, L.-V., Moffett, P., and Strömvik, M. V. (2017a). De novo computational identification of stress-related sequence motifs and microRNA target sites in untranslated regions of a plant transcriptome. *Sci. Rep.* *7*, 43861.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* *59*, 501–520.

Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J.H., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J. (2009a). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *PNAS*.

Mustroph, A., Juntawong, P., and Bailey-Serres, J. (2009b). Isolation of Plant Polysomal mRNA by Differential Centrifugation.

Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., and Narusaka, Y. (2009). *RRS1* and *RPS4* provide a dual *Resistance*- gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J.* *60*, 218–226.

Leborgne-Castel, N., and Bouhidel, K. (2014). Plasma membrane protein trafficking in plant-

microbe interactions: a plant cell point of view. *Front. Plant Sci.* 5, 735.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–439.

Ni, W.-J., and Leng, X.-M. (2016). miRNA-Dependent Activation of mRNA Translation. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)* 5, 83–86.

Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F., and Dangl, J.L. (2000). Eukaryotic Fatty Acylation Drives Plasma Membrane Targeting and Enhances Function of Several Type III Effector Proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* 101, 353–363.

Ohlrogge, J., and Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957–970.

Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J. (1994). Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6, 1567–1582.

Park, H.S., Himmelbach, A., Browning, K.S., Hohn, T., and Ryabova, L.A. (2001). A plant viral “reinitiation” factor interacts with the host translational machinery. *Cell* 106, 723–733.

Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.-C., Donzé, O., Lin, T.-A., Lawrence, J.C., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762–767.

Peart, J.R., Cook, G., Feys, B.J., Parker, J.E., and Baulcombe, D.C. (2002). An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.* 29, 569–579.

Rahmani, F., Hummel, M., Schuurmans, J., Wiese-Klinkenberg, A., Smeeckens, S., and Hanson, J. (2009). Sucrose Control of Translation Mediated by an Upstream Open Reading Frame-Encoded Peptide. *PLANT Physiol.* 150, 1356–1367.

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002).

MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* *16*, 1616–1626.

Ren, M., Qiu, S., Venglat, P., Xiang, D., Feng, L., Selvaraj, G., and Datla, R. (2011). Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *155*, 1367–1382.

Reyes, J.L., Rodrigo, M.-J., Colmenero-Flores, J.M., Gil, J.-V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D., And Covarrubias, A.A. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell Environ.* *28*, 709–718.

Rhoads, R.E. (2009). eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J. Biol. Chem.* *284*, 16711–16715.

Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 1134–1144.

Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G., and Estelle, M. (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* *9*, 745–757.

Rusk, N. (2008). When microRNAs activate translation. *Nat. Methods* *5*, 122–123.

Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., and Lomonossoff, G.P. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* *7*, 682–693.

Sanfaçon, H. (2015). Plant translation factors and virus resistance. *Viruses* *7*, 3392–3419.

Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., Ryabova, L.A., Boller, T., Ausubel, F., and Sheen, J. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* *32*, 1087–1102.

Sesma, A., Castresana, C., and Castellano, M.M. (2017). Regulation of Translation by TOR, eIF4E and eIF2 α in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. *Front. Plant Sci.* 8, 644.

Shen, Q., Zhang, P., Ho, T.H., Miséra, S., and Giraudat, J. (1996). Modular Nature of Absciscic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units That Are Necessary and Sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley. *PLANT CELL ONLINE* 8, 1107–1119.

Slavoff, S.A., Mitchell, A.J., Schwaid, A.G., Cabili, M.N., Ma, J., Levin, J.Z., Karger, A.D., Budnik, B.A., Rinn, J.L., and Saghatelian, A. (2013). Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells. *Nat. Chem. Biol.* 9, 59–64.

Sonenberg, N., and Dever, T.E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 56–63.

Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C., and Robaglia, C. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7, 26.

Stan, R., McLaughlin, M.M., Cafferkey, R., Johnson, R.K., Rosenberg, M., and Livi, G.P. (1994). Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J. Biol. Chem.* 269, 32027–32030.

Sun, Y., Li, L., Macho, A.P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.-M., and Chai, J. (2013). Structural Basis for flg22-Induced Activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science* (80-.). 342.

Sunkar, R., Kapoor, A., and Zhu, J.-K. (2006). Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. *PLANT CELL ONLINE* 18, 2051–2065.

Tabata, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Kotani, H., and Kato T, Asamizu E, Miyajima N, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A,

Muraki A, Nakayama S, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shinpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Sato S, de la Bastide M, Hu, F.P. (2000). Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 823–826.

Takahashi, H., Takahashi, A., Naito, S., and Onouchi, H. (2012). BAIUCAS: a novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences and its application to the *Arabidopsis thaliana* genome. *Bioinformatics* 28, 2231–2241.

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F. (2003). Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317–330.

Tasset, C., Bernoux, M., Jauneau, A., Pouzet, C., Brière, C., Kieffer-Jacquiod, S., Rivas, S., Marco, Y., and Deslandes, L. (2010). Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* Effector PopP2 Targets a Lysine Residue Essential for RRS1-R-Mediated Immunity in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* 6, e1001202.

Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., Bowman, C.L., et al. (2000). Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 816–820.

Thomashow, M.F., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., and Wu, R. (1998). Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* 118, 1–8.

Tolletier, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulnier, P., Manon, S., Teyssier, E., Payet, N., Avelange-Macherel, M.-H., and Macherel, D. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19, 1580–1589.

Torres, M. de, Sanchez, P., Fernandez-Delmond, I., and Grant, M. (2003). Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in *RPM1* -mediated resistance. *Plant J.* 33, 665–676.

- Tran, M.K., Schultz, C.J., and Baumann, U. (2008). Conserved upstream open reading frames in higher plants. *BMC Genomics* 9, 361.
- Turck, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F. (1998). A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2038–2044.
- Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F. (2004). Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiol.* 134, 1527–1535.
- Ueda, H., Yamaguchi, Y., and Sano, H. (2006). Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 31–45.
- Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 2, e82.
- Wang, J.-W., Czech, B., and Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138, 738–749.
- Wang, L., Li, H., Zhao, C., Li, S., Kong, L., Wu, W., Kong, W., Liu, Y., Wei, Y., Zhu, J.-K., et al. (2017). The inhibition of protein translation mediated by AtGCN1 is essential for cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Cell Environ.* 40, 56–68.
- Williams, S.J., Sohn, K.H., Wan, L., Bernoux, M., Sarris, P.F., Segonzac, C., Ve, T., Ma, Y., Saucet, S.B., Ericsson, D.J., et al. (2014). Structural Basis for Assembly and Function of a Heterodimeric Plant Immune Receptor. *Science* (80-.). 344.
- Wise, M.J., and Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci.* 9, 13–17.
- Wu, C.-H., Krasileva, K. V., Banfield, M.J., Terauchi, R., and Kamoun, S. (2015). The “sensor domains” of plant NLR proteins: more than decoys? *Front. Plant Sci.* 6, 5–7.

Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell* 138, 750–759.

Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., et al. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol.* 18, 74–80.

Xin, X.-F., and He, S.Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 473–498.

Xu, G., Greene, G., Yoo, H., Liu, L., Marqués, J., Motley, J., and Dong, X. (2017). Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature* 545, 487–490.

Yu, S., Lian, H., and Wang, J.-W. (2015). Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27, 1–7.

Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., et al. (2010). Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host Microbe* 7, 290–301.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. (2007). Dual Regulation Role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signaling during Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* Interaction 1[W][OA]. *Plant Physiol.* 145, 450–464.

Zhou, F., Roy, B., and von Arnim, A.G. (2010). Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. *BMC Plant Biol.* 10, 193.

Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G.

(2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* 125, 749–760.